





PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15553 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. April 1999 (01.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02896 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. September 1998 (23.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 41 929.1 23. September 1997 (23.09.97) DE 198 21 060.4 11. Mai 1998 (11.05.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH-INSTITUTS [DE/DE]; Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KROCZEK, Richard [DE/DE]; Molekulare Immunologie, Robert-Koch-Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: COSTIMULATING T-CELL POLYPEPTIDE, MONOCLONAL ANTIBODIES, THEIR PREPARATION AND USE		
(54) Bezeichnung: KO-STIMULIERENDES POLYPEPTID VON T-ZELLEN, MONOKLONALE ANTIKÖRPER SOWIE DIE HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG		
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-end;"> <div style="text-align: center;"> <p>PEL unstim. CD4+ PMA+ CD4+ PMA CD4+ I</p>  <p>A</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>PEL unstim. CD4+ PMA+ HTC PMA+ 75 min HTC PMA+ 6 h HTC PMA+ 20 h HTC PMA+ 60 h MOL-4 CD8 HUT-102 HUT-78 Jardel DGT5 Kapsen 200 DEL MOL-4V</p>  <p>B</p> </div> </div>		
(57) Abstract <p>A polypeptide (8F4 molecule) with a T-cell costimulating biological activity is disclosed, as well as monoclonal antibodies against said 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies, the use as medicaments of substances which inhibit the biological activity of the disclosed 8F4 polypeptide, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, in particular for preventing or treating diseases which involve the immune system, the use of said 8F4 molecule or cells containing said 8F4 molecule as medicaments, in particular for preventing or treating diseases which involve the immune system, and the use of substances which specifically recognise the disclosed polypeptide, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for diagnosing diseases which involve the immune system.</p>		

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

5 Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper,
10 natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Substanzen zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten und zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder
15 von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen,
20 insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Diagnose mittels eines ELISA-Nachweises, einer Durchflußzytometrie, eines Western Blot, eines Radioimmunnachweises, einer Nephelometrie oder einer histochemischen Anfärbung.

25

T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen, das von "Antigen-präsentierenden Zellen", z.B. dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, dargeboten wird, durch ihren T-Zell-Rezeptor. Die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor alleine aber reicht in den meisten Fällen nicht aus, um T-Lymphozyten ausreichend zu aktivieren. Hierzu bedarf es der
30 zusätzlichen, gleichzeitigen Stimulation (nachfolgend auch "Ko-Stimulation" genannt) durch andere Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Eines dieser Rezeptormoleküle ist der sogenannte CD28-Rezeptor, der durch das ko-stimulierende Molekül B7 stimuliert wird. Werden diese "ko-stimulatorischen" Moleküle, z.B. CD28, wirksam, so erreicht die Aktivierung der T-Zellen nach der Erkennung des Antigens durch

den T-Zell-Rezeptor ein ausreichendes Niveau. Nach einer solchen vollständigen Aktivierung exprimiert die T-Zelle zusätzliche Moleküle, z.B. CD25, CD69, CD71, auf der Oberfläche und synthetisiert zahlreiche Zytokine, z.B. IL-2 und IFN- γ , welche die Funktion von Botenstoffen haben. Sowohl diese zusätzlichen Oberflächenmoleküle wie auch die Zytokine dienen dem Informationsaustausch der T-Zelle mit anderen Zellen des Immunsystems. Durch die zusätzlichen Oberflächenmoleküle und die Zytokine lenken die aktivierten T-Zellen die gesamte Antigen-spezifische Immunabwehr. Auf diese Weise wird sowohl die Generierung von zytotoxischen Zellen ("Killerzellen") wie auch die Generierung von Antigen-spezifischen Antikörpern durch B-Zellen gesteuert. Zytotoxische Zellen wie auch die spezifisch gebildeten Antikörper eliminieren virale oder bakterielle Erreger, welche in den Körper eindringen. In einigen Fällen kommt es jedoch zu einem Überschießen der Immunreaktion und das Immunsystem richtet sich gegen die eigenen Körperzellen. Das führt zum Auftreten von "Autoimmunerkrankungen", z.B. zu rheumatoider Arthritis, Morbus Bechterew, Sjögren-Syndrom, Colitis ulcerosa, u.a. Einer der wesentlichen Orte der Kooperation zwischen Antigen-aktivierten T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems sind die sekundären lymphatischen Organe, darunter die Tonsillen. Hier werden die T-Lymphozyten durch das von dendritischen Zellen präsentierte Antigen aktiviert, hier interagieren T-Lymphozyten mit B-Zellen. Aufgrund dieser Interaktion sezernieren B-Zellen nach mehreren Zwischenstufen der Differenzierung Antigen-spezifische Antikörper vom IgM- und IgG-Typ.

Das am besten charakterisierte und bisher mit wirksamste ko-stimulatorische Molekül ist das CD28-Oberflächenmolekül (nachstehend CD28-Rezeptor oder CD28 genannt), das auf einem großen Teil der T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. *In vitro* führt die Ko-Stimulation durch CD28 nach Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor zu einer sehr starken Erhöhung der Zytokin-Sekretion von z.B. IL-2 und IFN- γ wie auch zu einer deutlichen Heraufregulation der Expression von Zelloberflächen-Molekülen wie CD25, CD69, CD71, welche für die Interaktion der T-Zellen mit anderen Immunzellen, z.B. B-Lymphozyten, notwendig sind; vgl. Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404. Durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor läßt sich des weiteren die Proliferation der T-Lymphozyten deutlich steigern. Auch wird durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor die T-Zell-Steuerung der B-Lymphozyten-Funktion so optimiert, daß es zu einer erhöhten Sekretion von Antikörpern kommt

Wenn die Funktion des CD28-Rezeptors aufgehoben wird, kommt es zu einer drastischen Funktionseinbuße der Immunabwehr. Das konnte anhand einer transgenen Maus gezeigt

werden, in der das CD28-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (ein sogenannter "CD28-knock-out"). Die auf diese Weise gestörte Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen führt zu einer fehlenden Ko-Stimulation. Diese wiederum führt zu einer Störung der T-Zell-Funktion, d.h. zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen und zu einer drastisch verminderten Synthese verschiedener Zytokine. Die fehlende Ko-Stimulation führt letztendlich zu einer verminderten Funktion der Antigen-spezifischen Immunabwehr. So wird u.a. durch das Fehlen von CD28 die Bildung Antigen-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper durch B-Lymphozyten auf 10% des Normwertes reduziert; vgl. Shahinian et al., *Science* 262 (1993), 609-612; Lucas et al. *Journal of Immunology* 154 (1995), 5757-5768. Über eine Ko-Stimulation durch CD28 kann man *in vitro* auch das Eindringen des Aids-Virus in T-Lymphozyten verhindern; vgl. Riley et al., *Journal of Immunology* 158 (1997), 5545-5553. Entsprechende Versuche sind *in vivo* noch nicht durchgeführt worden. Bekanntlich schaltet CD28 viele Zytokin-Gene an, die *in vivo* zu erheblichen Nebenwirkungen führen können. Die Blockade der Rezeptoren von CD28 durch ein lösliches CTLA-4-Immunglobulin-Molekül ist im Affenmodell erfolgreich eingesetzt worden, um die Abstoßung von transplantierten Nieren zu verhindern. Hierbei wurde CTLA-4 in Kombination mit einem Antikörper gegen das CD40-Liganden-Molekül eingesetzt worden; vgl. Kirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8789-8794. Die Blockade der CD28-Rezeptoren betrifft jedoch sämtliche T-Lymphozyten und nicht nur die bereits aktivierten, da CD28 auf T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird.

Es besteht somit ein Bedarf an einem ko-stimulierenden Oberflächenmolekül, das nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist, bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Substanzen, z.B. monoklonale Antikörper gegen das ko-stimulatorische Oberflächenmolekül, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten des Oberflächenmoleküls bereitzustellen.

In einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, charakterisiert dadurch, daß a) das Polypeptid auf aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) oder dendritischen Zellen vorkommt, und b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein

Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa (Kilodalton) hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-PAGE.

5

Das erfindungsgemäße Polypeptid (nachstehend auch 8F4-Molekül oder 8F4 genannt) wird erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert, und zwar sowohl auf CD4⁺- wie auch auf CD8⁺-T-Zellen. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE weist das 8F4-Molekül ein Molekulargewicht zwischen etwa 55 und 60 kDa (Kilodalton) auf. Das 8F4-Molekül ist aus

10

zwei Peptidketten zusammengesetzt, wobei die beiden Peptidketten in einer reduzierenden SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 27 und etwa 29 kDa aufweisen. Histologisch kann man das 8F4-Antigen auf aktivierten T-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe der Tonsillen und Lymphknoten eindeutig nachweisen, insbesondere in Keimzentren, dem Ort der Interaktion von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei der Generierung von Antikörpern.

15

Ex vivo isolierte tonsilläre T-Zellen sind zu etwa 50-80% positiv für das 8F4-Antigen und weisen Zeichen einer fortgeschrittenen Aktivierung auf. Das 8F4-Molekül ist auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nicht nachweisbar.

Eine wichtige biologische Aktivität des 8F4-Moleküls ist seine ko-stimulierende Aktivität von T-Lymphozyten. Die ko-stimulierende Aktivität kann bestimmt werden nach Linsley, et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. Die ko-stimulierende Aktivität des 8F4-Moleküls ähnelt der ko-stimulierenden Aktivität des CD28-Moleküls, welches als zentrales Verstärkungselement der Antigen-Erkennung durch das Immunsystem identifiziert

25

worden ist. Das 8F4-Molekül unterscheidet sich jedoch in vielen Aspekten von CD28. So muß die Expression des 8F4-Moleküls auf der Oberfläche der T-Zellen erst induziert werden, während CD28 konstitutiv exprimiert wird. Auch in der Funktion sind deutliche Unterschiede nachweisbar: Die Ko-Stimulation über CD28 führt zur Überexpression zahlreicher Lymphokine, u.a. des Interleukin-2 (IL-2). Auch die Ko-Stimulation über 8F4 führt zu einer verstärkten Sekretion von Lymphokinen, nicht jedoch des IL-2. Somit unterscheidet sich die ko-stimulatorische Aktivität des 8F4-Moleküls von der Aktivität des CD28-Moleküls. Da die Stimulation über 8F4 nicht alle Zytokin-Gene anschaltet, ist eine Ko-Stimulation über 8F4 *in vivo* vorteilhaft, z.B. gegenüber einer Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor. Auch unterscheidet sich die Induktion, die Expression, der Expressionsort und die Funktion des

30

8F4-Moleküls von allen anderen bekannten ko-stimulatorisch wirksamen Molekülen.

Bei dem erfindungsgemäßen 8F4-Molekül handelt es sich um ein neues Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist. Die Expression *in vivo* deutet u.a. auf eine wesentliche Beteiligung des 8F4-Moleküls an der Kooperation von T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems wie B-Zellen oder dendritischen Zellen im Rahmen der humoralen und zellulären Immunabwehr gegen Viren und Bakterien hin.

10 Nach Expression hat das 8F4-Molekül *in vitro* eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf verschiedene Funktionen der T-Lymphozyten:

1. Deutliche Verstärkung der Proliferation von T-Lymphozyten.
2. Deutliche Verstärkung der Synthese bestimmter Zytokine durch die T-Lymphozyten.
- 15 3. Stark erhöhte Expression von Steuerungs-Molekülen, z.B. Oberflächenmoleküle und Zytokine, auf und in T-Lymphozyten.
4. Deutliche Verbesserung der T-Zell-induzierten Antikörper-Bildung (IgM und IgG) durch B-Zellen.

20 Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin bereit, ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon. Ein biologisch aktives Fragment oder Analogon ist ein Fragment oder Analogon, das ebenfalls eine ko-

25 stimulatorische Wirkung auf T-Zellen-Lymphozyten zeigt oder zumindest im Sinne einer Blockade eine biologische Wirkung entfaltet. Bevorzugt ist ein Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon, das mindestens 60% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Polypeptid eine

30 Aminosäuresequenz, die mindestens 80% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon.

Insbesondere bevorzugt ist ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation

von T-Zellen und umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

Die Erfindung schließt ein allele-Varianten, Fragmente und Analoga von dem 8F4-Molekül.

- 5 Diese Varianten schließen ein natürlich vorkommende allele-Varianten, Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren, Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren, Deletionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren deletiert worden sind und Additionsanaloga, bei denen eine oder mehrere
- 10 Aminosäuren hinzugefügt worden sind. Deletion und Addition von einer oder mehreren Aminosäuren können entweder an einer internen Region des Polypeptids oder an dem Amino- oder Carboxyterminus gemacht werden.

- Erfindungsgemäße Polypeptide, fusioniert zu heterologen Polypeptiden, werden ebenfalls
- 15 umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf DNA-Sequenzen, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon kodieren.

20

Diese DNA-Sequenzen schließen die Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 (Fig. 16) genauso wie allele-Varianten, Fragmente, und Analoga mit biologischer Aktivität ein.

- Bevorzugt ist eine DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der
- 25 Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
 - b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
 - c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen
- 30 in (a) und (b) hybridisieren. Vorzugsweise hybridisieren die vorstehenden DNA-Sequenzen zueinander unter stringenten Bedingungen.

Weiterhin werden bereitgestellt Vektoren, die diese DNA-Sequenzen enthalten und Wirtszellen, die mit diesen Vektoren transformiert oder transfiziert sind.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können auf übliche Weise nach dem von Milstein und Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-497, beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Insbesondere können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper hergestellt werden, indem Mäuse mit T-Zellen, die *in vitro* mit Phorbolmyristatacetat (PMA) und Ionomycin ("2-Signal-System") für 24 h aktiviert worden sind, immunisiert werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse werden mit Myelom-Zellen fusioniert. 8F4-spezifische monoklonale Antikörper werden dadurch identifiziert, daß sie 2-Signal-aktivierte, jedoch nicht ruhende T-Lymphozyten erkennen. Auch färben 8F4-spezifischen Antikörper mit einem Signal (entweder PMA oder Ionomycin) stimulierte T-Zellen in einem auf übliche Weise durchgeführten Nachweisverfahren nicht an. 8F4-spezifische Antikörper ergeben ein typisches Anfärbemuster von tonsillären T-Zellen und erkennen ein Antigen von etwa 55 bis 60 kDa in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE und von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa in einer reduzierenden SDS-PAGE auf aktivierten T-Lymphozyten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Hybridomzellen, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper herstellen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, als Arzneimittel. Besonders bevorzugt ist Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, natürlicher oder synthetischer Liganden, Agonisten oder Antagonisten des 8F4-Moleküls. Diese Substanzen können als Arzneimittel verwendet werden, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Die Blockade der Interaktion des 8F4-Antigens mit seinem Rezeptor verbessert z.B. die Verhinderung der Organabstoßung, da eine solche Blockade nur bereits aktivierte T-Lymphozyten betrifft. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids als Arzneimittel. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Polypeptid, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann ebenfalls auf übliche Weise in Zellen eingeführt werden, so daß diese Zellen das Polypeptid z.B. konstitutiv exprimieren. Z.B. kann die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz oder ein Vektor, umfassend die das Polypeptid
5 codierende Nukleinsäuresequenz, z.B. die cDNA oder genomische DNA, Promotoren, Enhancer und andere für die Expression der Nukleinsäuresequenz benötigten Elemente, in eine Zelle eingeschleust werden. Vorzugsweise wird die 8F4 cDNA (2641 Nukleotide), dargestellt in Fig. 16 (SEQ ID NO: 1), oder Fragmente oder Derivate hiervon zur Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Fragmenten hiervon eingesetzt.

10

Ferner kann das erfindungsgemäße Polypeptid z.B. mittels Liposomen in Zellen eingeführt werden, die das Polypeptid danach auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Erfindungsgemäß können diese Zellen als Arzneimittel verwendet werden, insbesondere zur Wiederherstellung der korrekten Regulation des menschlichen Immunsystems, wie sie im Rahmen zahlreicher
15 chronischer Infektionserkrankungen auftritt, z.B. im Rahmen von AIDS, Asthmaerkrankungen oder bei chronischen viralen Hepatitiden (z.B. HCV, HBV), oder zur Stimulation des Immunsystems *in vitro* oder *in vivo*, wie z.B. für die Therapie von Krebserkrankungen verwendet werden.

20 In einer weiteren Ausführungsform werden Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist verwendet, wobei die Substanzen insbesondere einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen. Zur Diagnose kann z.B. ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie
25 oder eine histochemische Anfärbung verwendet werden. Die Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid erkennen, umfassen auch Nukleinsäuresequenzen, wobei diese vorzugsweise zur Hybridisierung und/oder zur Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Amplifikation (z.B. PCR) eingesetzt werden.

30 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Substanzen, die den Signaltransduktionsweg des erfindungsgemäßen Polypeptids in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) und die Verwendung dieser Substanzen als Arzneimittel.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Substanzen, die die

Heraufregulation des erfindungsgemäßen Polypeptids an die T-Zelloberfläche verhindern und deren Verwendung als Arzneimittel.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Polypeptid oder Fragemente
5 hiervon durch ein transgenes Tier exprimiert.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Erfindung ein transgenes Tier, bei dem das Gen, das für das erfindungsgemäße Polypeptid kodiert, ausgeschaltet worden ist („Knock-out“)

10 Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung:

Fig. 1 zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitation des 8F4-Antigens aus aktivierten humanen T-Zellen. (a) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 12%
15 Polyacrylamidgel (PAA-Gel)) reduzierend, (b) SDS-PAGE (10% PAA-Gel) nicht reduzierend. Angegeben sind die Bedingungen zur Elution des Antigens von der 8F4-Matrix. "SDS" bedeutet Natriumdodecylsulfat; "DTT" bedeutet Dithiothreitol, "Mr" bedeutet Molekulargewicht und "kDa" bedeutet Kilodalton.

20 Fig. 2a zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen ist in Klammern angegeben. "PMA" bedeutet Phorbolmyristatacetat; "PHA" bedeutet Phytohaemagglutinin; "OKT3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD3; "MLR" bedeutet gemischte Lymphocytenreaktion (engl.: *mixed lymphocyte reaction*); "mAK 9.3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD28;
25 "SEB" bedeutet Staphylokokken Enterotoxin B.

Fig. 2b zeigt das Ergebnis einer Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin in einer Durchflußzytometrie. Aufgetragen ist die Immunfluoreszenz (log) gegen die Zellzahl.

30 Fig. 3 zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind. "bio" bedeutet biotinylierter Antikörper.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer histochemischen Untersuchung zur Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

Fig. 5 zeigt das Ergebnis einer Expressions-Analyse von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen in einer Durchflußzytometrie. "bioPE" bedeutet biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin Sekundärreagenz.

Fig. 6 zeigt die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern (CD69, CD45) in einer Durchflußzytometrie.

10

Fig. 7 zeigt schematisch die verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4. Offene Kreise (O) stehen für 8F4 Antikörper; Dreiecke (◆) stehen für unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps; ausgefüllte Kreise (●) stehen für anti-CD28-Antikörper-9.3.

15

Fig. 8 zeigt einen schematischen Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28. "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper; "ATAC" bedeutet "Activation induced T cell derived And Chemokine related"; "cpm" bedeutet radioaktive Zerfälle pro Minute.

20

Fig. 9 zeigt schematisch die Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen. "ng" bedeutet Nannogramm; "ml" bedeutet Milliliter; "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper.

Fig. 10 zeigt schematisch die Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Fig. 11 zeigt die Expression des 8F4-Antigens auf der MOLT-4V-Zelllinie. MOLT-4V-Zellen wurden mit einem Fluorescein-markierten 8F4-Antikörper (8F4-FITC) gefärbt und in der Durchflußzytometrie untersucht (offene Linie, im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (ausgefüllte Linie)).

30

Fig. 12 zeigt die zweidimensionale Gelelektrophorese. Ein MOLT-4V Zell-Lysat aus 300×10^6 Zellen wurde wie beschrieben immunpräzipitiert. Das Eluat wurde auf einer nicht

reduzierenden SDS-PAGE (10% PAA) aufgetrennt und der Bereich um 60 kDa aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Reduktion der Disulfidbrücken im 8F4-Molekül wurde das Gelstück für 1 h bei 50°C in 5,3 M Harnstoff, 0,5 M Tris, pH 8,0, 1% SDS, 1% β -Mercaptoethanol inkubiert und die freien Cysteinreste im Molekül mit 10 mM Iodoacetamid (Sigma, Deisenhofen) alkyliert (30 min, 37°C). Das Gelstück wurde für weitere 30 min. in 1× SDS-PAGE Probenpuffer equilibriert und auf einem 12% PAA-SDS-Gel (mit Sammelgel) montiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen. Die Lage des 8F4-Proteins wurde durch Oberflächeniodinierung bestimmt (vgl. Fig. 1) und ist durch Umkreisung markiert. (Alle nicht im Detail beschriebenen Prozeduren wurden nach Standardmethoden durchgeführt, siehe z.B. Westermeier, R., Electrophoresis in Practice, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997).

Fig. 13 zeigt eine Hybridisierung mit Oligo 1 (SEQ ID NO:3). Auf Nitrocellulose-Filter immobilisierte Lamda-Klone wurden mit Oligo 1 wie in den Beispielen beschrieben hybridisiert. Dargestellt ist die Exposition auf einem Röntgenfilm (Ausschnitt).

Fig. 14 zeigt eine Northern-Blot Analyse mit der 8F4-cDNA. Die Hybridisierung eines Northern-Blots mit der 8F4-cDNA ergibt eine Bande, die im Gel zwischen der 18S und 28S RNA läuft. In Fig. 14A ist das Verhalten als 2-Signal-abhängiges (s.o.) Aktivierungsantigen gezeigt: Keine Expression in ruhenden lymphoiden Zellen (PBL), starke Expression in PMA+Ionomycin aktivierten CD4⁺ T-Zellen und deutlich verringerte Expression mit PMA bzw. Ionomycin alleine. Fig. 14B zeigt die Expressionsstärke der mRNA nach unterschiedlichen Stimulationszeiten (T-Zellen (über Nylonwolladhärenz aufgereinigt, NTC), stimuliert mit PMA+Ionomycin). Daneben die MOLT-4-Zelllinien (ATCC CRL-1582), die nur eine minimale Expression zeigt, ganz rechts die für die Klonierung verwendete MOLT-4V, die ein deutliches Signal zeigt. Aufgetragen ist außerdem die RNA weiterer Zelllinien, auf denen in der durchflußzytometrischen Analyse keine 8F4-Expression nachweisbar war: CEM (ATCC CCL-119), HUT-102 (ATCC TIB-162), HUT-78 (ATCC TIB-161), Jurkat (ATCC TIB-152), DG75 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ACC83), Karpas 299 (Fischer, P. et al. (1988), Blood, 72:234-240), DEL (Barbey, S. et al. (1990), Int. J. Cancer, 45:546-553)

Fig. 15 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptids 8F4 (SEQ ID NO:2).

Fig. 16 zeigt die 8F4 cDNA (SEQ ID NO:1).

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

5

Beispiel 1: Generierung des 8F4-Antikörpers

Balb/c Mäuse wurden mit humanen T-Zellen immunisiert, welche vorher für 24 h mit 33 ng/ml des Phorbolesters Phorbolmyristatacetat (PMA), (Sigma, Deisenhofen), und mit 200
10 ng/ml des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) aktiviert worden sind (sogenannte "2-Signal-Aktivierung"). Nach dreimaligem Boostern wurden die Milzzellen der Mäuse mit dem Myelom P3X63Ag8.653 (ATCC Nr.CRL-1580) fusioniert und Antikörpersezernierende Hybridome nach Standardmethoden generiert; vgl. Peters und Baumgarten, Monoclonal Antibodies. Springer, Heidelberg, 1992. Das Durchmustern der erhaltenen
15 Antikörper erfolgte auf aktivierten versus ruhenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie. Aktivierte ("2-Signal-Aktivierung") und ruhende T-Zellen wurden mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995. Nur die Antikörper, welche Moleküle erkannten, die ausschließlich durch PMA und das
20 Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin auf der T-Zell-Oberfläche induziert wurden, jedoch nicht durch eines der Agenzien alleine ("2-Signal-Moleküle") wurden für eine weitere Reinigung ausgewählt. Die erhaltenen Antikörper wurden in der Durchflußzytometrie auf Ähnlichkeit bzw. Verschiedenheit zu bekannten Antikörpern gegen Aktivierungsmoleküle (vgl. Tabelle 1) auf T-Zellen untersucht. Kriterien waren hierbei neben der schon oben erwähnten "2 Signal-
25 Abhängigkeit" die Kinetik der Induktion auf stimulierten T-Zellen und die Expression auf verschiedenen Zelllinien.

Beispiel 2: Immunpräzipitation des 8F4-Antigens

30 Oberflächenmoleküle von aktivierten humanen T-Zellen wurden mit ^{125}I nach Standardmethoden iodiniert und mit dem Antikörper 8F4 nach Standardmethoden immunpräzipitiert; vgl. Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice. Academic Press, London, 1996. Für die Immunpräzipitation wurde der Antikörper nach Schneider et al., *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), 10766-10769, an Protein G (Pharmacia,
35 Freiburg) gekoppelt (8F4-Matrix). Das Waschen der Matrix erfolgte nach Schneider et al.,

siehe vorstehend. Das immunpräzipitierte 8F4-Molekül wurde auf übliche Weise in der SDS-PAGE (nicht reduziert und reduziert) auf seine molekulare Masse analysiert; Goding, siehe vorstehend.

5 Beispiel 3: Durchflußzytometrie

Die Analyse der 8F4-tragenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie erfolgte nach Standardmethoden; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995.

10 Ausführungsbeispiel 3.1: Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen.

CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Agenzien in üblicher Weise stimuliert und auf Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie nach
15 üblichem Verfahren untersucht. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen betrug mit den verschiedenen Agenzien zwischen 24 Stunden und 144 Stunden. Aktivierungsmodi: Phorbolmyristataacetat (PMA; 33 ng/ml), Ionomycin (200ng/ml), Phytohaemagglutinin (PHA 1,5 mg/ml), OKT3 (monoklonaler Antikörper gegen CD3), gemischte Lymphocytenreaktion (MLR, "mixed lymphocyte reaction" zwischen 50 000 CD4⁺-T-Zellen und 100 000 B-Zellen),
20 mAk 9.3 (monoklonaler Antikörper gegen CD28), Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 0,1 ng/ml). Die Auswertung ergab, daß verschiedene Stimuli geeignet sind, das 8F4-Molekül auf T-Zellen zu induzieren, jedoch in unterschiedlicher Expressionsdichte. Am potentesten sind neben den stark wirksamen pharmakologischen Agenzien PMA und Ionomycin solche Stimuli, die eine ko-stimulatorische Situation darstellen, wie z.B. akzessorische Zellen in der
25 MLR oder der ko-stimulierende mAk 9.3.

Ausführungsbeispiel 3.2: Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin.

30 CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) in üblicher Weise stimuliert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie in üblicher Weise untersucht. Das Molekül ist bereits nach vier Stunden auf der Oberfläche detektierbar, gehört also zur Klasse der relativ frühen Aktivierungsantigene. Auch nach 48 Stunden wird das Antigen noch gut

exprimiert.

Ausführungsbeispiel 3.3: Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind.

5

50 000 CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit 100 000 allogenen tonsillären B-Zellen für 6 Tage ko-kultiviert (37°C, 5,2% CO₂, 200 µl RPMI 1640 mit 10% FCS in 96-Well-Rundbodenplatten) und danach auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie untersucht. Zu Beginn der Kultivierung wurden verschiedene Antikörper (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCII; alle 10 mg/ml) der Kultur hinzugefügt, um die Abhängigkeit der 8F4-Induktion von diesen Molekülen zu überprüfen. Die Expression von 8F4 läßt sich nur durch Blockade der CD86/CD28-Interaktion blockieren, nicht jedoch durch Blockade von CD80. Der Blockade-Effekt ist hierbei noch stärker als die Blockade von MHCII (Positivkontrolle).

15

Ausführungsbeispiel 3.4: Expression von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen.

B-Zellen bzw. T-Zellen aus tonsillärem Gewebe von verschiedenen Quellen wurden auf übliche Weise gereinigt und in der Durchflußzytometrie auf die Expression des 8F4-Moleküls untersucht. Während auf B-Zellen das Signal nicht eindeutig signifikant war, exprimierten etwa 50-80% der tonsillären T-Zellen das 8F4-Molekül in unterschiedlicher Dichte. Es lassen sich hierbei zwei Populationen unterschiedlich hoher Fluoreszenz (8F4-"high" bzw. -"low") erkennen, deren Ausprägung bei den verschiedenen Tonsillen unterschiedlich ist. So weist z.B. Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"low"- und andere Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"high"-Population auf.

25

Ausführungsbeispiel 3.5: Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern.

Aus humanen Tonsillen gereinigte T-Zellen wurden in der 2-Farben-Durchflußzytometrie auf die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern analysiert. In Tonsillen wird 8F4 ko-exprimiert mit CD69 wie auch mit Varianten des CD45-Moleküls. Hierbei sind die 8F4-"high"-Zellen eindeutig mit einer CD45RO-Expression korreliert, während die 8F4-negativen Zellen den Phänotyp CD45RA tragen. CD45RA wird hauptsächlich von sogenannten "naiven" T-Zellen exprimiert, wohingegen CD45RO mit einer Effektorzellfunktion assoziiert ist. Es handelt sich also bei den 8F4⁺-Zellen hauptsächlich um

"reife" T-Zellen. CD45RO und CD45RA sind Isoformen von CD45.

Beispiel 4: Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

- 5 Tonsilläres Gewebe in Gefrierschnitten wurde mit dem 8F4-Antikörper in der APAAP-Technik (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) nach Standardverfahren angefärbt. 8F4⁺-Zellen wurden vorzugsweise im Keimzentrum der Tonsillen vorgefunden, aber z. T. auch in der T-Zell-Zone der Tonsillen.

10 Beispiel 5: Ko-Stimulation von T-Lymphozyten

- 96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT3 (verschiedene Verdünnungen eines Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml)
15 beladen. Als Isotypkontrolle wurden der OKM1 Antikörper oder der 2A11 Antikörper (beide 2 µg/ml) verwendet.

Ausführungsbeispiel 5.1: Verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4.

20

- Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers OKT3 aktiviert und gleichzeitig mit dem 8F4-Antikörper oder einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps ko-stimuliert. Als Vergleich wurde die Kostimulation mit dem anti-CD28-Antikörper-9.3, einem der stärksten
25 bekannten ko-stimulatorischen Antikörper, durchgeführt. Selbst bei optimaler Stimulation über CD3 ist sowohl mit dem mAk 8F4 als auch mit mAk 9.3 noch ein Ko-stimulatorischer Effekt zu sehen. Im suboptimalen OKT3-Bereich, d.h. dem Bereich, in dem ohne Ko-stimulation keine volle T-Zellaktivierung mehr erzielt werden kann, können beide Antikörper die Expression anderer Aktivierungsantigene um den Faktor 4 bis 100 steigern, wobei die
30 Wirkung des anti-CD28-Antikörpers auch noch bei sehr hohen OKT3-Verdünnungen sichtbar wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei sehr schwacher OKT3-Stimulation das 8F4-Antigen nicht mehr auf die Zelloberfläche gebracht und somit auch nicht vom mAk 8F4 kreuzvernetzt werden kann.

Ausführungsbeispiel 5.2: Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28.

Gereinigte CD8⁺-T-Zellen wurden für 51 h mit einer suboptimalen Konzentration des
5 monoklonalen Antikörpers OKT3 stimuliert. Als Ko-Stimulatoren wurden Antikörper 8F4, Antikörper 9.3 (anti-CD28) und Isotypkontrollen eingesetzt (jeweils 2 µg/ml). Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde die Proliferationsrate der T-Zellen durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt. In Parallelkulturen wurde der Überstand entfernt und die Konzentration der Zytokine ATAC/Lymphotoctin und IL-2 bestimmt. Bezüglich der IL-2-Synthese
10 unterscheiden sich 8F4 und CD28 sehr stark voneinander. CD28-Ko-Stimulation führt, wie auch im Stand der Technik beschrieben (Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404), zu einer sehr starken IL-2 Sekretion. Mit 8F4 hingegen liegt die IL-2 Produktion unterhalb der Nachweisgrenze. Die Proliferation ist jedoch in beiden Ansätzen vergleichbar, das autokrine Wachstum der T-Zellen muß also bei 8F4-Ko-
15 Stimulation auf andere Faktoren zurückgeführt werden. Auch in bezug auf die Sekretion des Lymphokins ATAC unterscheiden sich die beiden Antikörper in der ko-stimulatorischen Wirkung kaum.

Beispiel 6: Bestimmung der von B-Zellen synthetisierten Immunglobuline nach Interaktion
20 mit 8F4-ko-stimulierten T-Zellen

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT 3 (1:500 bis 1:80 000 Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle
25 wurde der OKM1-Antikörper oder der 2A11-Antikörper verwendet. In einigen Experimenten wurde zum Vergleich eine Ko-Stimulation mit einem CD28-spezifischen Antikörper ("9.3") durchgeführt; vgl. Hara et al., *Journal of Experimental Medicine* 161 (1985), 1513-1524. In die so vorbehandelten Kulturplatten wurden pro well 50 000 gereinigte (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4⁺-T-Zellen (>95% Reinheit) aus dem peripheren Blut und 25 000
30 allogene tonsilläre B-Zellen (negativ-Selektion durch T-Zell-Rosettierung mit Schafserythrocyten, 96% Reinheit) pipettiert und für 8 Tage ko-kultiviert. Nach dieser Zeitdauer wurde der Überstand entnommen und auf die Konzentration sezernierter Immunglobuline vom IgM- und IgG-Typ im ELISA auf übliche Weise analysiert; vgl. Nishioka and Lipsky, *Journal of Immunology* 153 (1994), 1027-1036.

Ausführungsbeispiel 6.1: Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen.

Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden für 8 Tage mit allogenen B-Zellen aus Tonsillen in üblicher Weise ko-kultiviert. Bei einer suboptimalen Stimulation der T-Zellen mit dem OKT3-Antikörper verstärkt die Ko-Stimulation der T-Zellen durch 8F4 die Sekretion der IgM- und IgG-Immunglobuline um den Faktor 40.

Beispiel 7: Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Periphere T-Zellen (über Nylonwolladhärenz in üblicher Weise aufgereinigt) wurden für 20 h mit PHA (1.5 mg/ml) stimuliert und über 6 Tage mit IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch OKT3 mit und ohne Ko-Stimulation durch mAk 8F4 (2 µg/ml) restimuliert. Die Apoptose wurde durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid in der Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt. Bei suboptimaler Stimulation über den T-Zellrezeptor-Komplex kann Ko-Stimulation über 8F4 den Anteil apoptotischer Zellen um den Faktor 4 senken.

Beispiel 8: Klonierung der für das 8F4-Protein kodierenden cDNA

Durch Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten 8F4 Antikörper wurde in der Durchflußzytometrie eine Zelllinie (MOLT-4V) identifiziert, die das 8F4-Antigen konstitutiv exprimiert (Fig. 11). Bei der Linie MOLT-4V handelt es sich um eine Variante der humanen T-Zelllinie MOLT-4 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1582).

Diese Zelllinie wurde für die präparative Aufreinigung des 8F4-Antigens mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers verwendet:

Die Zellen wurden im großen Maßstab (150 l) in Rollerkulturflaschen kultiviert, abzentrifugiert und die zellulären Proteine mit einem Lysepuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen), 1% NP-40 (Boehringer, Mannheim)) extrahiert. Zellkerne und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation entfernt. Das so gewonnene Zell-Lysat wurde für 2 h mit Sepharose CL4-B (Pharmacia, Freiburg) präinkubiert, um unspezifisch an Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der bereits in Beispiel 2 beschriebenen

8F4-Immunaффinitätsmatrix (4 h bei 4°C). Die Matrix wurde in eine Säule gefüllt und nun mehrfach unter Bedingungen gewaschen, die eine ausschließliche Entfernung von unspezifisch bindenden Proteinen bedingt (1. 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40; 2. 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40, 0,1% SDS; 3. 0,2 M Glycin pH 4,0, 0,5% CHAPS (Merck, Darmstadt)). Die Elution des 8F4-Antigens von der Matrix erfolgte mit 0,2 M Glycin, pH 2,5, 0,5% CHAPS. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration eingengt (Amicon Centricon 10, Millipore, Eschborn).

Um eine weitere Aufreinigung des 8F4 Moleküls zu erzielen, wurde die dimere Struktur des Moleküls (siehe Fig. 1) in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (nicht reduzierend/reduzierend) ausgenutzt: Da die meisten Proteine als Monomer vorkommen, laufen sie in der Gelelektrophorese auf einer Diagonale, das 8F4-Molekül dagegen läuft in der 1. Dimension (nicht reduzierend) bei 55-60 kDa und in der 2. Dimension (reduzierend) bei 27 und 29 kDa (Fig. 12).

Für die präparative Auftrennung wurden die Immunpräzipitate von jeweils 20×10^9 Zellen wie vorstehend bei der Beschreibung der Fig. 12 dargestellt in der Zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel mit Coomassie Blau G250 (Biorad, München) gefärbt und die in Fig. 12 bezeichneten Areale aus dem Gel getrennt ausgeschnitten (8F4-27kDa bzw. 8F4-29 kDa).

Für die Peptidmikrosequenzierung wurden die Proteine aus jeweils 4 Gelstücken mit Trypsin verdaut und aus dem Gel eluiert. Die tryptischen Fragmente wurden über HPLC aufgetrennt und einzelne Fraktionen einer Edman-Degradation unterzogen (Verfahren ausführlich beschrieben in Groettrup, M. et al. (1996), Eur. J. Immunol., 26:863-869).

Aus der Sequenzierung der 8F4-29kDa Probe wurde neben Bruchstücken bekannter Proteine eine Peptidsequenz XRLTDVT gefunden, für die in sämtlichen Proteindatenbanken kein Korrelat im humanen Bereich gefunden wurde.

Eine eindeutige Rückübersetzung einer Proteinsequenz in eine DNA-Sequenz ist nicht möglich. So ergibt die Rückübersetzung der obigen Peptidsequenz in ein Oligonucleotid mit 17 Nucleotiden eine Zahl von 2048 Permutationen. Ein spezielles Verfahren (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182:738-751) ermöglicht jedoch das Screening einer cDNA Bank

mit degenerierten Oligonucleotiden. Auf Basis der gefundenen Peptidsequenz wurden 2 Oligonucleotide (Oligo 1 (SEQ ID NO:3): MGN CTS ACN GAY GTN AC, 512 Permutationen; Oligo 2 (SEQ ID NO:4): MGN YTD ACN GAY GTN AC, 1024 Permutationen) synthetisiert.

5

Für das Screening wurde eine cDNA Bank aus der auch für die Proteinaufreinigung verwendeten MOLT-4V Zelllinie konstruiert:

Gesamt-RNA wurde nach der Guanidinium/CsCl-Methode (Chirgwin, J.M. et al. (1979), Biochemistry 18:5294-5299) isoliert, mRNA über Oligo-dT-Cellulose-Säulen (Gibco BRL, Eggenstein) angereichert. Die Erst- und Zweit-Strang cDNA Synthese wurde unter Verwendung eines kommerziellen cDNA-Synthesystems (Gibco BRL, Eggenstein) unter Verwendung von Oligo-dT-Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die cDNA wurde über EcoRI-Adaptoren in den Lambda ZAPII Vektor (Stratagene, Heidelberg) ligiert.

15

Die cDNA-Bank wurde gemäß Standardmethoden (Vogeli, G. and Kaytes, P.S. (1987), Methods Enzymol., 152:407-515) plattiert und die Lambda-DNA auf Nitrocellulose-Filtern (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell, Dassel) immobilisiert.

Die oben genannten Oligonucleotide wurden unter Verwendung von T4 Polynucleotidkinase (NEBL, Schwalbach) und γ -³²P ATP (NEN Du Pont, Brüssel) radioaktiv markiert (Wallace, R.B. and Miyada, C.G. (1987), Methods Enzymol., 152:432-442).

Die Hybridisierung der Filter erfolgte in einem für degenerierte Oligonucleotide beschriebenen Puffer (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182:738-751) mit 3 M Tetramethylammoniumchlorid (Roth, Karlsruhe) bei 48°C. Die Filter wurden, wie in der o.g. Referenz beschrieben, gewaschen, wobei die Waschtemperatur 50°C betrug. Nach Exposition der Filter auf einem Röntgenfilm zeigten sich ca. 50 positive Klone pro 100 000 plattierter Phagen (Fig. 13).

6 Klone wurden weiter charakterisiert, indem sie nach der vom Herstellers des Vektors (Stratagene, Heidelberg) beschriebenen Methode durch in vivo Excision in einen Plasmidvektor überführt wurden und mit T3 und T7 Primern ansequenziert wurden (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA). Einer der Klone enthielt eine Sequenz, deren Translation genau die gesuchte Peptidsequenz ergab. Dieser Klon

wurde zur Hybridisierung eines Northern Blots (Fig. 14) verwendet (KroczeK, R.A. (1993), J. Chromatogr., 618, 133-145). Das Expressionsmuster der mRNA entsprach genau der Expression des 8F4-Moleküls, wie es aus durchflußzytometrischen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper bekannt war. Da der gefundene Klon nur das 3'-Ende der gesuchten cDNA enthielt, wurde ein 5'-gelegenes Fragment zur Isolierung der gesamten 8F4 cDNA verwendet. Mehrere Klone wurden auf beiden Strängen sequenziert.

Die 8F4 cDNA (2641 Nucleotide) ist in Fig. 16 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:1 dargestellt und codiert für ein Protein mit 199 Aminosäuren (Nucleotide 68-664), dargestellt in Fig. 15 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:2. Die Sequenzierung mehrerer unabhängiger Klone aus der cDNA-Bank ergab einige Abweichungen von der hier gezeigten Sequenz, die jedoch alle in der 3'-untranslatierten Region liegen:

Pos. 909-910: Deletion

Pos. 1631: T->C

Pos. 2074: G->T

Pos. 2440: G->C

Pos. 2633: alternative Polyadenylierungsstelle

Tab.1:

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper (Klon), deren Herkunftsquelle (Quelle), die Spezifität gegen ihr jeweiliges Antigen (Spezifität) und gegebenenfalls ihre Markierung (Label) wider.

Spezifität	Label	Isotyp	Klon	Quelle
CD3	Cy-Chrome	IgG1	UCHT1	Pharmingen, Hamburg
CD3	-	IgG2a	OKT3	ATCC CRL-8001
CD11b	-	IgG2b	OKM1	ATCC CRL-8026
CD25	FITC	IgG2a	B1.49.9	Immunotech, Hamburg
CD28	-	IgG2a	9.3	Immunex Corp., Seattle
CD45RA	Cy-Chrome	IgG2b	HI100	Pharmingen, Hamburg
CD45RO	FITC	IgG2a	UCLH1	Immunotech, Hamburg
CD69	FITC	IgG1	FN50	Pharmingen, Hamburg
CD80	-	IgG1	L307.4	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	-	IgG2b	IT2.2	Pharmingen, Hamburg
CD154	FITC	IgG1	TRAP-1	Hybridom ¹
MHCII	-	IgG2a	L243	ATCC HB-55
8F4	-	IgG1	8F4	Hybridom ¹
8F4	Biotin	IgG1	8F4	Hybridom ¹
Isotyp IgG1	-	IgG1	2A11	Hybridom ^{1,2}
Isotyp IgG1	FITC	IgG1	2A11	Hybridom ^{1,2}
Isotyp IgG1	Biotin	IgG1	ASA-1	Hybridom ¹

¹ Die Hybridomzelllinie wurde auf übliche Weise generiert, der Antikörper aufgereinigt und gegebenenfalls markiert.

² gerichtet gegen ein synthetisches Peptid

Die in den Beispielen verwendeten Antiseren und Sekundärreagenzien wurden bezogen von: Ziege-anti-Maus-Ig, FITC-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Streptavidin, PE-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Kaninchen-anti-Maus-Ig-Fraktion, von Sigma, Deisenhofen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten
durch
den Direktor des Robert-Koch-Instituts
(B) STRASSE: Nordufer 20
(C) ORT: Berlin
(D) BUNDESLAND: Berlin
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 13353

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ko-stimulierendes Polypeptid von T-
Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRAEGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2641 Basenpaare
(B) ART: Nucleotide
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGAGAGCCTG AATTCACTGT CAGCTTTGAA CACTGAACGC GAGGACTGTT AACTGTTTCT	60
GGCAAACATG AAGTCAGGCC TCTGGTATTT CTTTCTCTTC TGCTTGCGCA TTAAAGTTTT	120
AACAGGAGAA ATCAATGGTT CTGCCAATTA TGAGATGTTT ATATTCACA ACGGAGGTGT	180
ACAAATTTTA TGCAAATATC CTGACATTGT CCAGCAATTT AAAATGCAGT TGCTGAAAGG	240
GGGGCAAATA CTCTGCGATC TCACTAAGAC AAAAGGAAGT GGAAACACAG TGTCCATTAA	300
GAGTCTGAAA TTCTGCCATT CTCAGTTATC CAACAACAGT GTCTCTTTTT TTCTATACAA	360
CTTGGACCAT TCTCATGCCA ACTATTACTT CTGCAACCTA TCAATTTTTG ATCCTCCTCC	420
TTTTAAAGTA ACTCTTACAG GAGGATATTT GCATATTTAT GAATCACAAC TTTGTTGCCA	480
GCTGAAGTTC TGGTTACCCA TAGGATGTGC AGCCTTTGTT GTAGTCTGCA TTTTGGGATG	540
CATACTTATT TGTTGGCTTA CAAAAAAGAA GTATTCATCC AGTGTGCACG ACCCTAACGG	600

	TGAATACATG	TTCATGAGAG	CAGTGAACAC	AGCCAAAAAA	TCTAGACTCA	CAGATGTGAC	660
	CCTATAATAT	GGAACCTCTGG	CACCCAGGCA	TGAAGCACGT	TGGCCAGTTT	TCCTCAACTT	720
5	GAAGTGCAAG	ATTCTCTTAT	TTCCGGGACC	ACGGAGAGTC	TGACTTAACT	ACATACATCT	780
	TCTGCTGGTG	TTTTGTTC	TCTGGAAGAA	TGACTGTATC	AGTCAATGGG	GATTTTAAACA	840
	GACTGCCTTG	GTACTGCCGA	GTCTCTCTCA	AACAAACACC	CTCTTGCAAC	CAGCTTTGGA	900
10	GAAAGCCCAG	CTCCTGTGTG	CTCACTGGGA	GTGGAATCCC	TGTCTCCACA	TCTGCTCCTA	960
	GCAGTGCATC	AGCCAGTAAA	ACAAACACAT	TTACAAGAAA	AATGTTTTAA	AGATGCCAGG	1020
15	GGTACTGAAT	CTGCAAAGCA	AATGAGCAGC	CAAGGACCAG	CATCTGTCCG	CATTTCACTA	1080
	TCATACTACC	TCTTCTTTCT	GTAGGGATGA	GAATTCCTCT	TTTAATCAGT	CAAGGGAGAT	1140
	GCTTCAAAGC	TGGAGCTATT	TTATTTCTGA	GATGTTGATG	TGAACTGTAC	ATTAGTACAT	1200
20	ACTCAGTACT	CTCCTTCAAT	TGCTGAACCC	CAGTTGACCA	TTTTACCAAG	ACTTTAGATG	1260
	CTTTCTTG	CCCTCAATTT	TCTTTTTTAA	AATACTTCTA	CATGACTGCT	TGACAGCCCA	1320
25	ACAGCCACTC	TCAATAGAGA	GCTATGTCTT	ACATTCTTTC	CTCTGCTGCT	CAATAGTTTT	1380
	ATATATCTAT	GCATACATAT	ATACACACAT	ATGTATATAA	AATTCATAAT	GAATATATTT	1440
	GCCTATATTC	TCCCTACAAG	AATATTTTTG	CTCCAGAAAG	ACATGTTCTT	TTCTCAAATT	1500
30	CAGTTAAAAT	GGTTTACTTT	GTTCAAGTTA	GTGGTAGGAA	ACATTGCCCG	GAATTGAAAG	1560
	CAAATTTATT	TTATTATCCT	ATTTTCTACC	ATTATCTATG	TTTTCATGGT	GCTATTAATT	1620
35	ACAAGTTTAG	TTCTTTTTGT	AGATCATATT	AAAATTGCAA	ACAAAATCAT	CTTTAATGGG	1680
	CCAGCATTCT	CATGGGGTAG	AGCAGAATAT	TCATTTAGCC	TGAAAGCTGC	AGTTACTATA	1740
	GGTTGCTGTC	AGACTATACC	CATGGTGCCT	CTGGGCTTGA	CAGGTCAAAA	TGGTCCCCAT	1800
40	CAGCCTGGAG	CAGCCCTCCA	GACCTGGGTG	GAATTCCAGG	GTTGAGAGAC	TCCCCTGAGC	1860
	CAGAGGCCAC	TAGGTATTCT	TGCTCCCAGA	GGCTGAAGTC	ACCCTGGGAA	TCACAGTGGT	1920
45	CTACCTGCAT	TCATAATTCC	AGGATCTGTG	AAGAGCACAT	ATGTGTCAGG	GCACAATTCC	1980
	CTCTCATAAA	AACCACACAG	CCTGGAAATT	GGCCCTGGCC	CTTCAAGATA	GCCTTCTTTA	2040
	GAATATGATT	TGGCTAGAAA	GATTCTTAAA	TATGTGGAAT	ATGATTATTC	TTAGCTGGAA	2100
50	TATTTTCTCT	ACTTCCTGTC	TGCATGCCCA	AGGCTTCTGA	AGCAGCCAAT	GTCGATGCAA	2160
	CAACATTTGT	AACTTTAGGT	AACTGGGAT	TATGTTGTAG	TTTAACATTT	TGTAAGTGTG	2220
55	TGCTTATAGT	TTACAAGTGA	GACCCGATAT	GTCATTATGC	ATACTTATAT	TATCTTAAGC	2280
	ATGTGTAATG	CTGGATGTGT	ACAGTACAGT	ACTGAACTTG	TAATTTGAAT	CTAGTATGGT	2340
	GTTCTGTTTT	CAGCTGACTT	GGACAACCTG	ACTGGCTTTG	CACAGGTGTT	CCCTGAGTTG	2400
60	TTTGCAAGTT	TCTGTGTGTG	GGGTGGGGTA	TGGGGAGGAG	AACCTTCATG	GTGGCCCACC	2460
	TGGCCTGGTT	GTCCAAGCTG	TGCCTCGACA	CATCCTCATC	CCCAGCATGG	GACACCTCAA	2520

GATGAATAAT AATTCACAAA ATTTCTGTGA AATCAAATCC AGTTTAAAGA GGAGCCACTT 2580
 ATCAAAGAGA TTTTAACAGT AGTAAGAAGG CAAAGAATAA ACATTGATA TTCAGCAACT 2640
 5 G 2641

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 199 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Lys	Ser	Gly	Leu	Trp	Tyr	Phe	Phe	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Ile	Lys	1	5	10	15
Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ala	Asn	Tyr	Glu	Met	Phe	Ile	20	25	30	
Phe	His	Asn	Gly	Gly	Val	Gln	Ile	Leu	Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp	Ile	Val	35	40	45	
Gln	Gln	Phe	Lys	Met	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Gly	Gln	Ile	Leu	Cys	Asp	50	55	60	
Leu	Thr	Lys	Thr	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Ser	Ile	Lys	Ser	Leu	65	70	75	80
Lys	Phe	Cys	His	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Phe	Phe	Leu	85	90	95	
Tyr	Asn	Leu	Asp	His	Ser	His	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Cys	Asn	Leu	Ser	100	105	110	
Ile	Phe	Asp	Pro	Pro	Pro	Phe	Lys	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Tyr	Leu	115	120	125	
His	Ile	Tyr	Glu	Ser	Gln	Leu	Cys	Cys	Gln	Leu	Lys	Phe	Trp	Leu	Pro	130	135	140	
Ile	Gly	Cys	Ala	Ala	Phe	Val	Val	Val	Cys	Ile	Leu	Gly	Cys	Ile	Leu	145	150	155	160
Ile	Cys	Trp	Leu	Thr	Lys	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	His	Asp	Pro	165	170	175	
Asn	Gly	Glu	Tyr	Met	Phe	Met	Arg	Ala	Val	Asn	Thr	Ala	Lys	Lys	Ser	180	185	190	
Arg	Leu	Thr	Asp	Val	Thr	Leu	195												

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotide
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Ja

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

MGNCTSACNG AYG TNAC

17

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotide
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: DNA

(iii) HYPOTHETISCH: Ja

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

MGNYTDACNG AYG TNAC

17

Patentansprüche

1. Ein Polypeptid

5 a) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen,

b) das auf aktivierten $CD4^{+}$ - und $CD8^{+}$ -T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen oder dendritischen Zellen vorkommt, und

10

c) das ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

15

2. Ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäure umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

20

3. Das Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen gemäß Anspruch 2 und umfassend die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

25

4. Eine DNA-Sequenz, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein Fragment hiervon kodiert.

5. DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang

30

b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und

c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen in (a) und (b) hybridisieren.

6. Ein Plasmid oder ein viraler DNA-Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz nach

Anspruch 4 oder 5.

7. Eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, stabil transformiert oder transfiziert mit einem Plasmid oder DNA-Vektor nach Anspruch 6.

5

8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 7 zur Expression des Polypeptids in der Wirtszelle.

10 9. Ein Antikörper, der das Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-3 bindet.

10. Ein Antikörper gemäß Anspruch 9, der ein monoklonaler Antikörper ist.

11. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3
15 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der Ca^{2+} -Ionophore Ionomycin aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu einem Antikörper-sezernierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.

20 12. Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 10 oder 11 erzeugt.

13. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, als Arzneimittel.

25 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

15. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von
30 Autoimmunkrankheiten, zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und zur Behandlung einer Dysregulation des Immunsystems.

16. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 als Arzneimittel.

17. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

5 18. Verwendung von Zellen, enthaltend das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, als Arzneimittel.

19. Verwendung von Zellen nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen
10 Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

20. Verwendung von Substanzen, die das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.
15

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Moleküle umfassen.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei zur Diagnose eine Hybridisierungs- oder
20 Nukleinsäureamplifikationstechnik (z.B. PCR) verwendet wird.

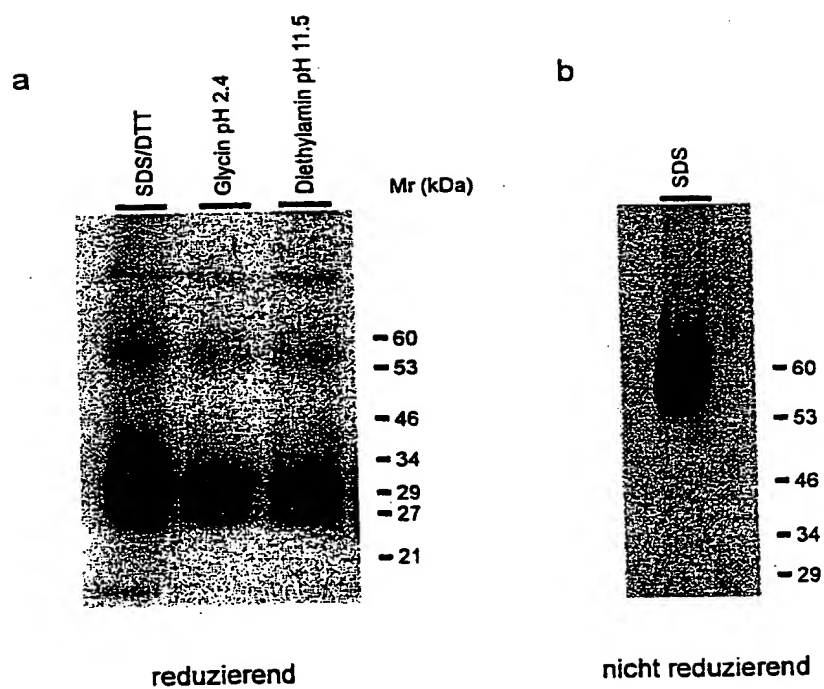
23. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

25 24. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet wird.

25. Verwendung von Substanzen, die den Signaltransduktionsweg des Polypeptids nach
30 einem der Ansprüche 1-3 in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) als Arzneimittel.

26. Verwendung von Substanzen, die die Heraufregulation des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 an die T-Zelloberfläche verhindern als Arzneimittel.

1/17

**FIG. 1**

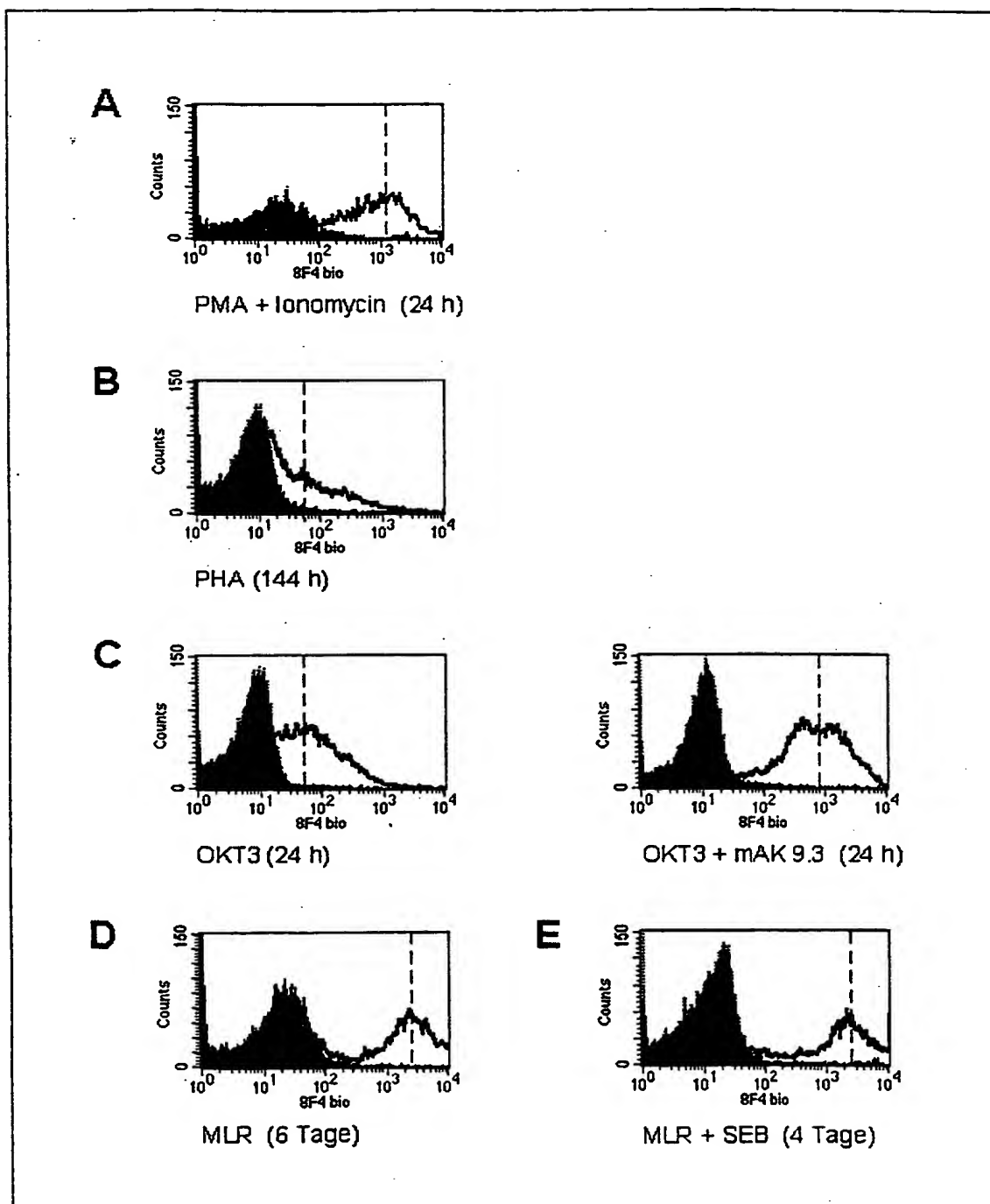
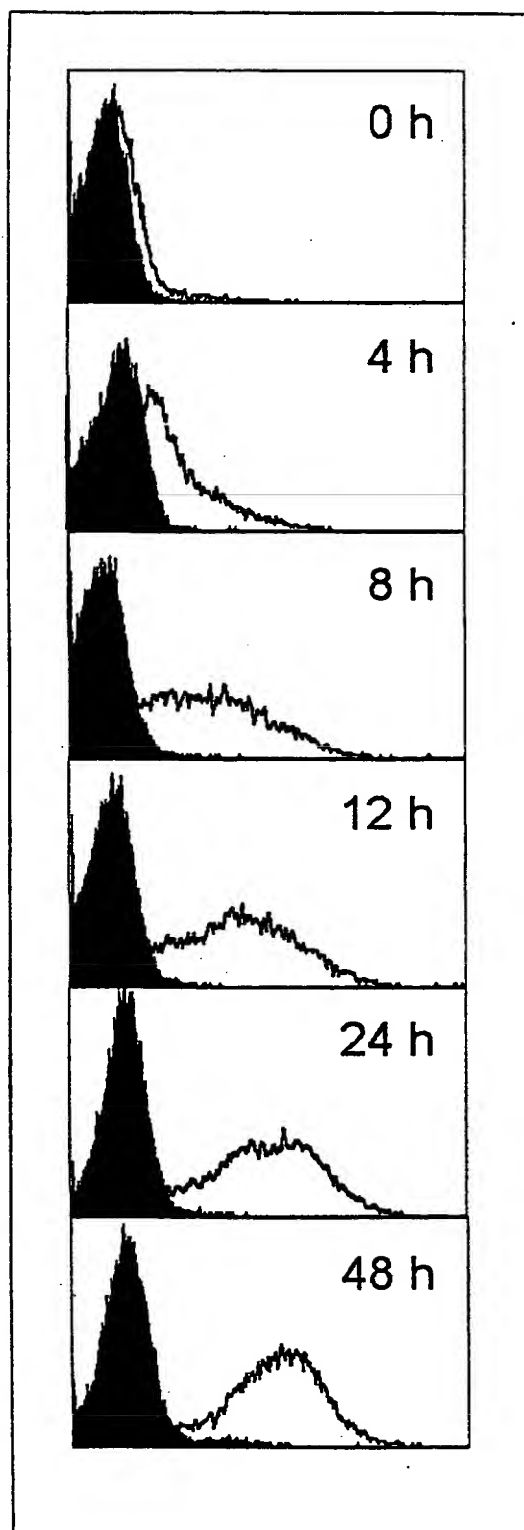


FIG. 2a

**FIG. 2b**

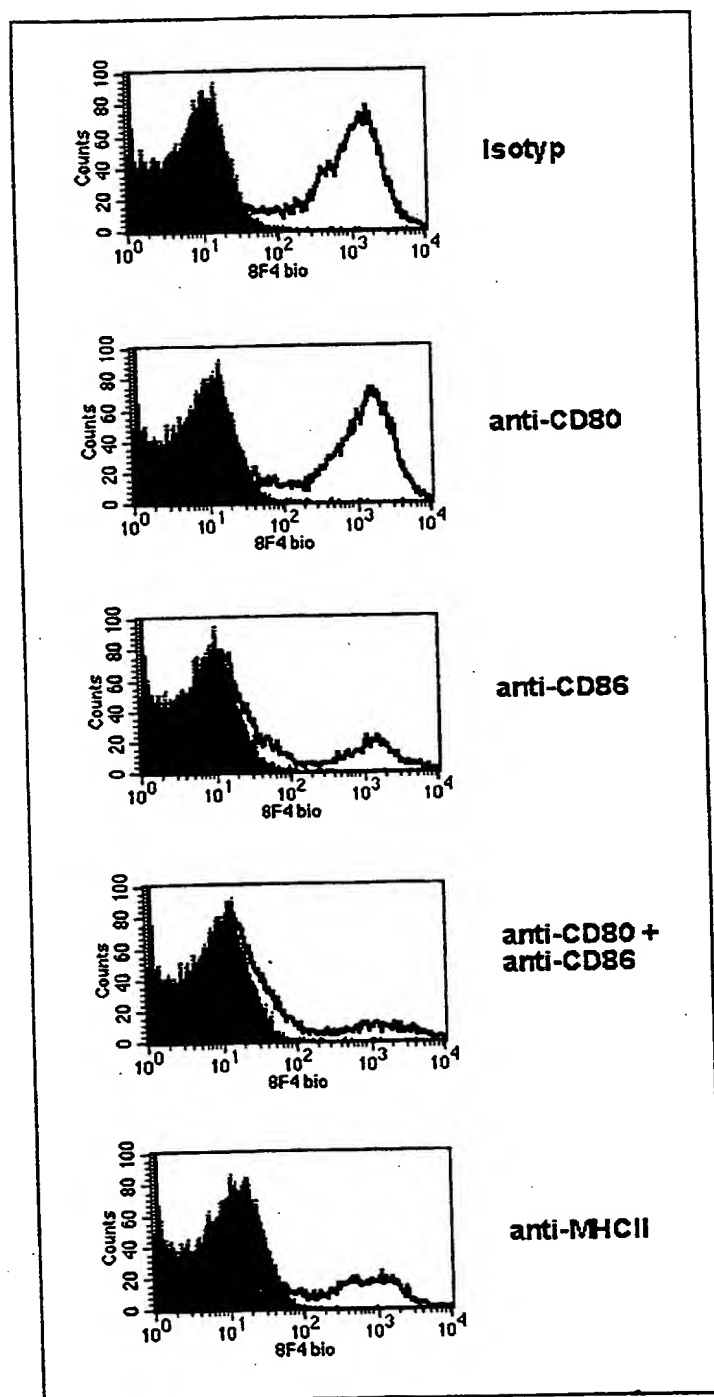


FIG. 3

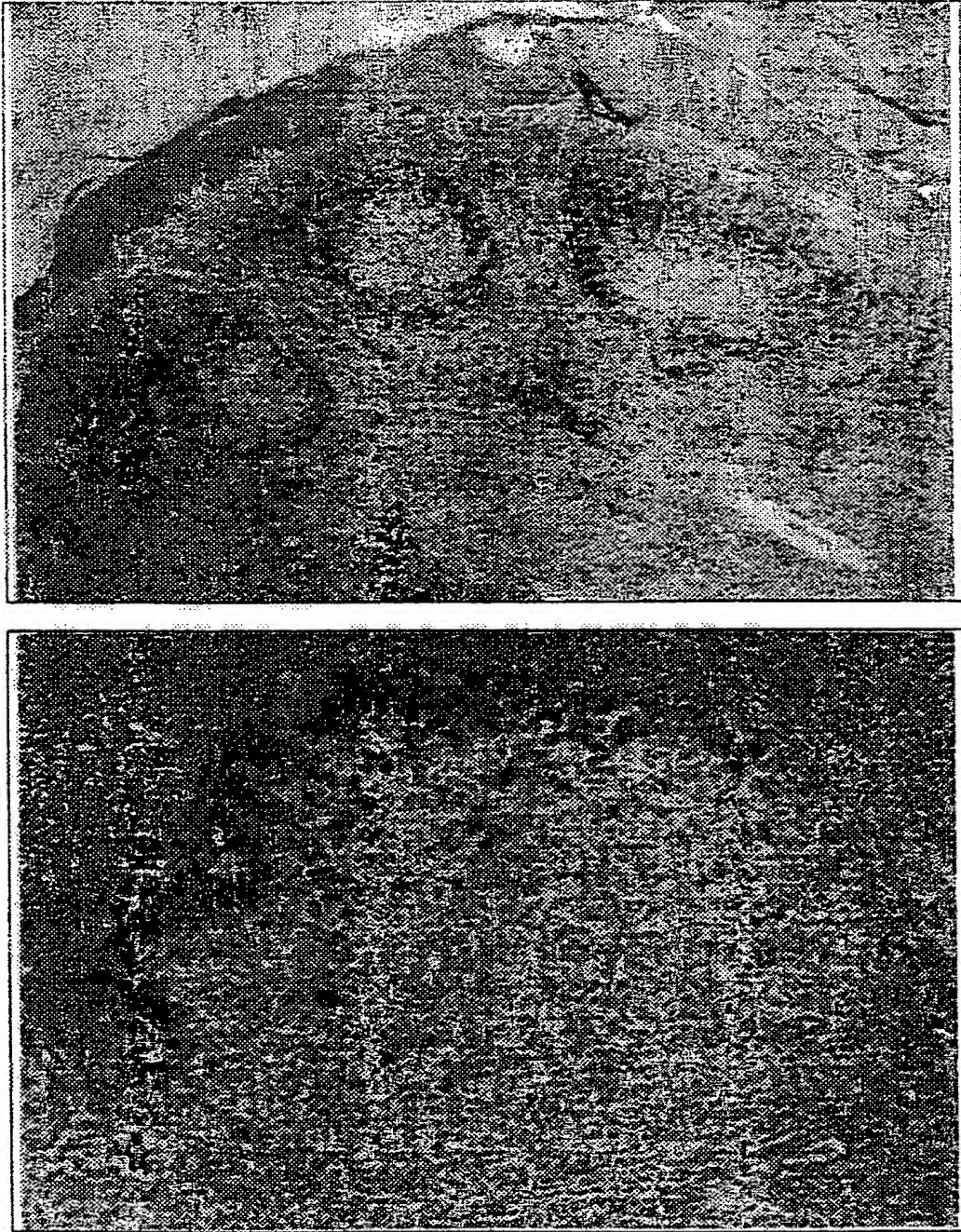


FIG. 4

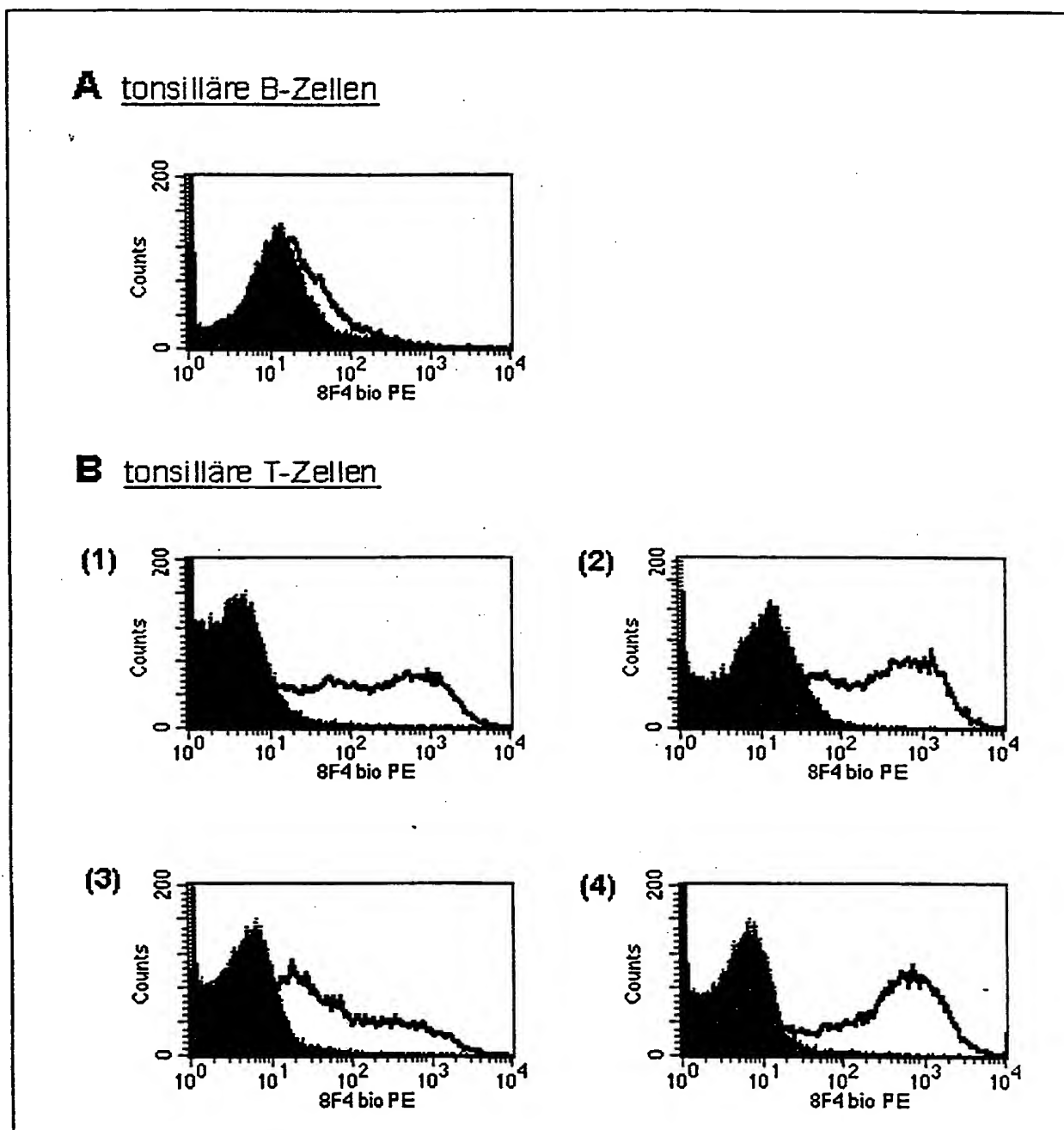


FIG. 5

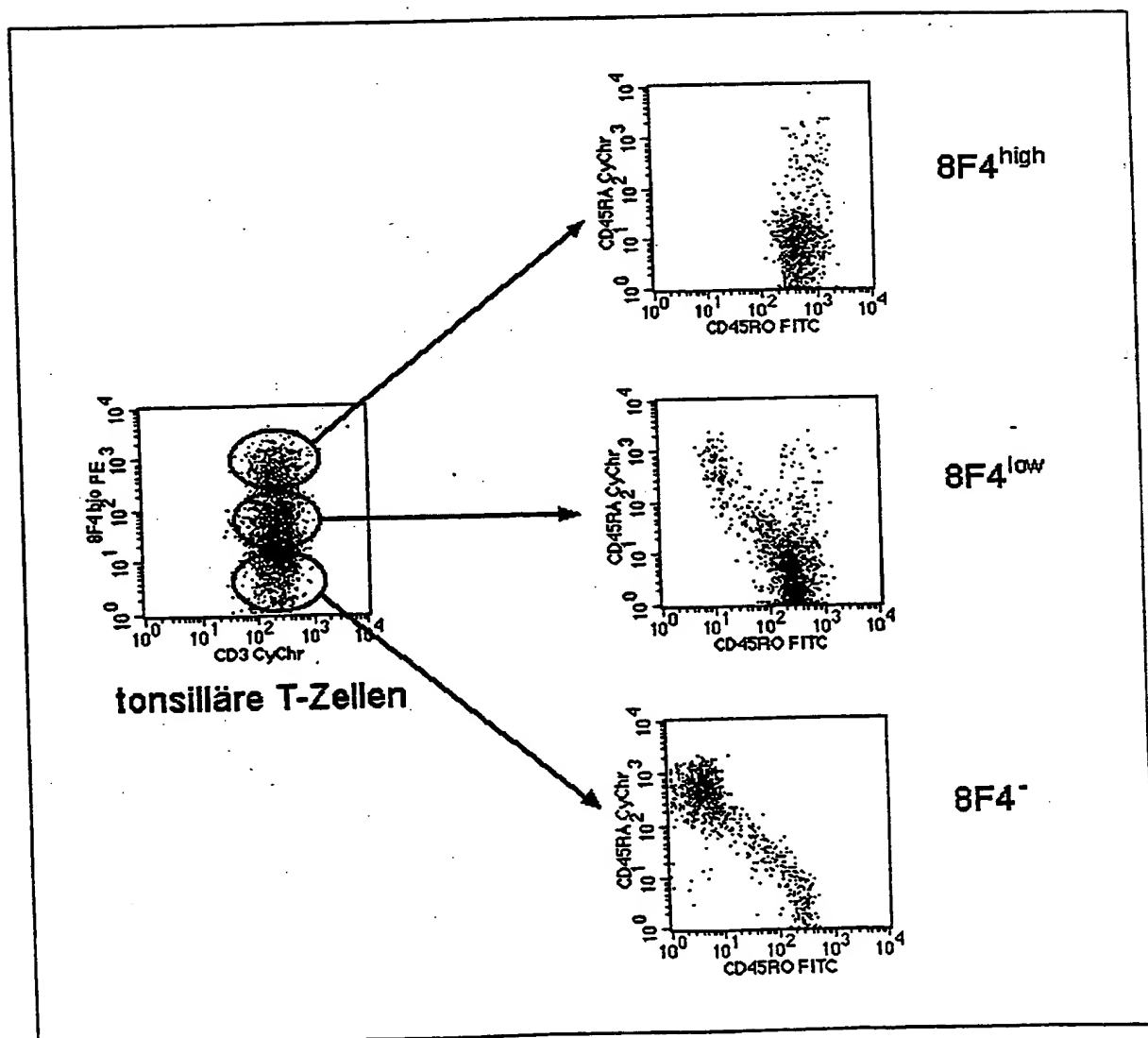
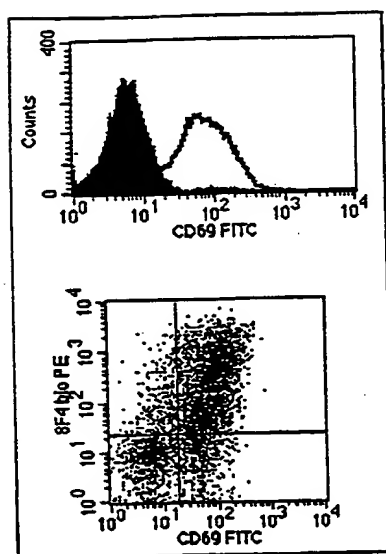


FIG. 6

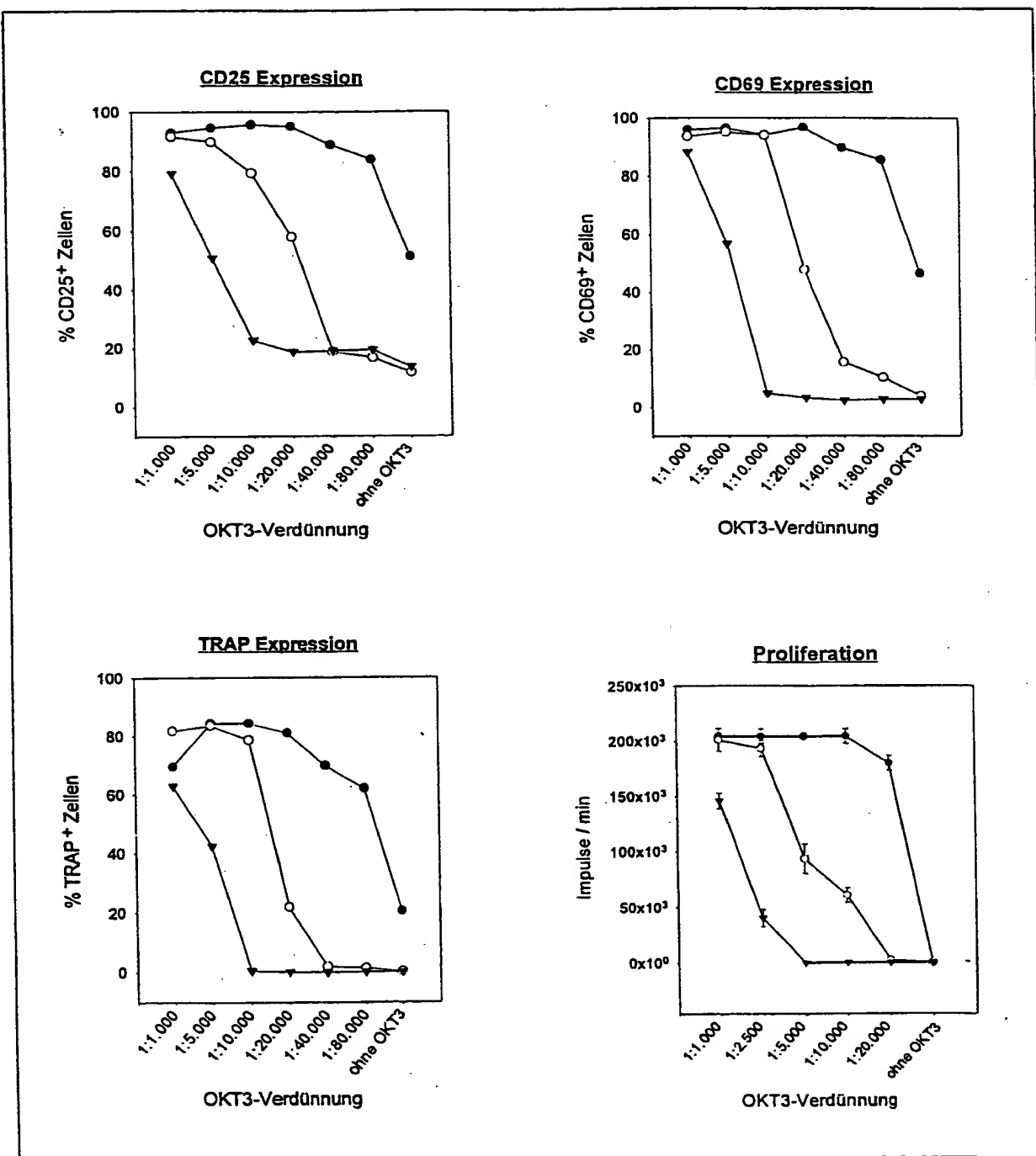


FIG. 7

9/17

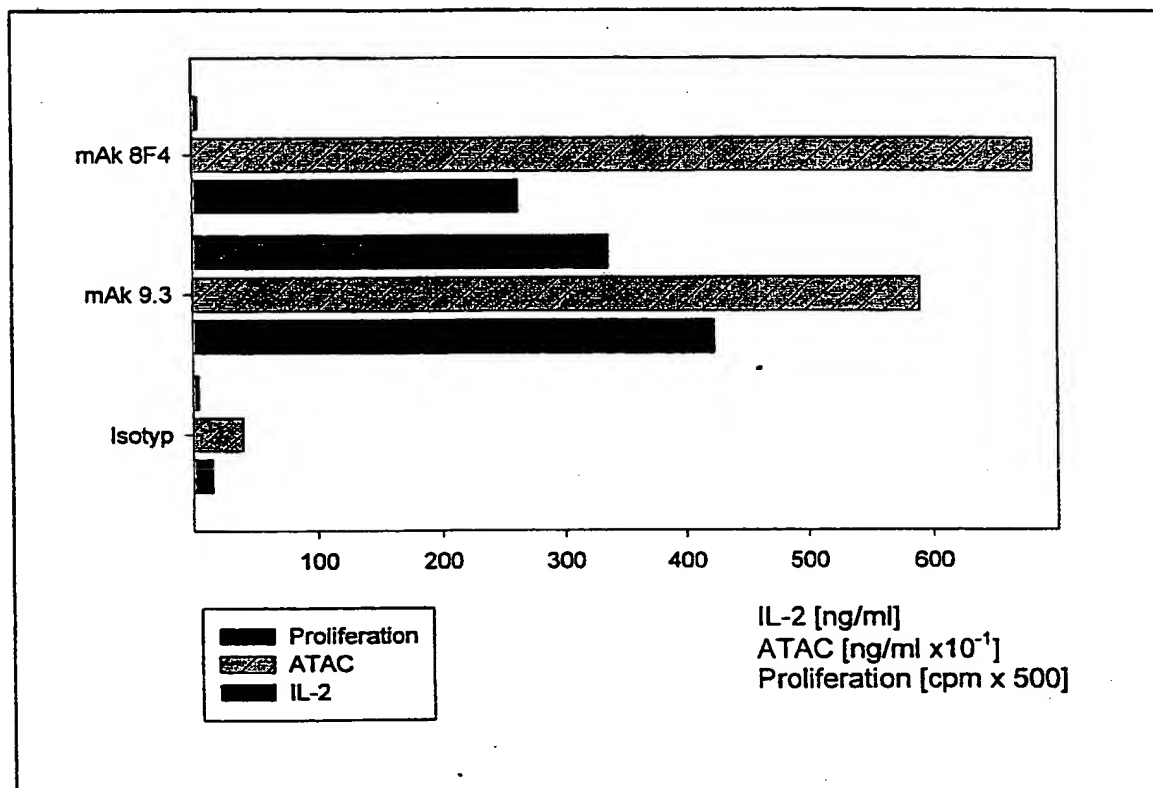


FIG. 8

10/17

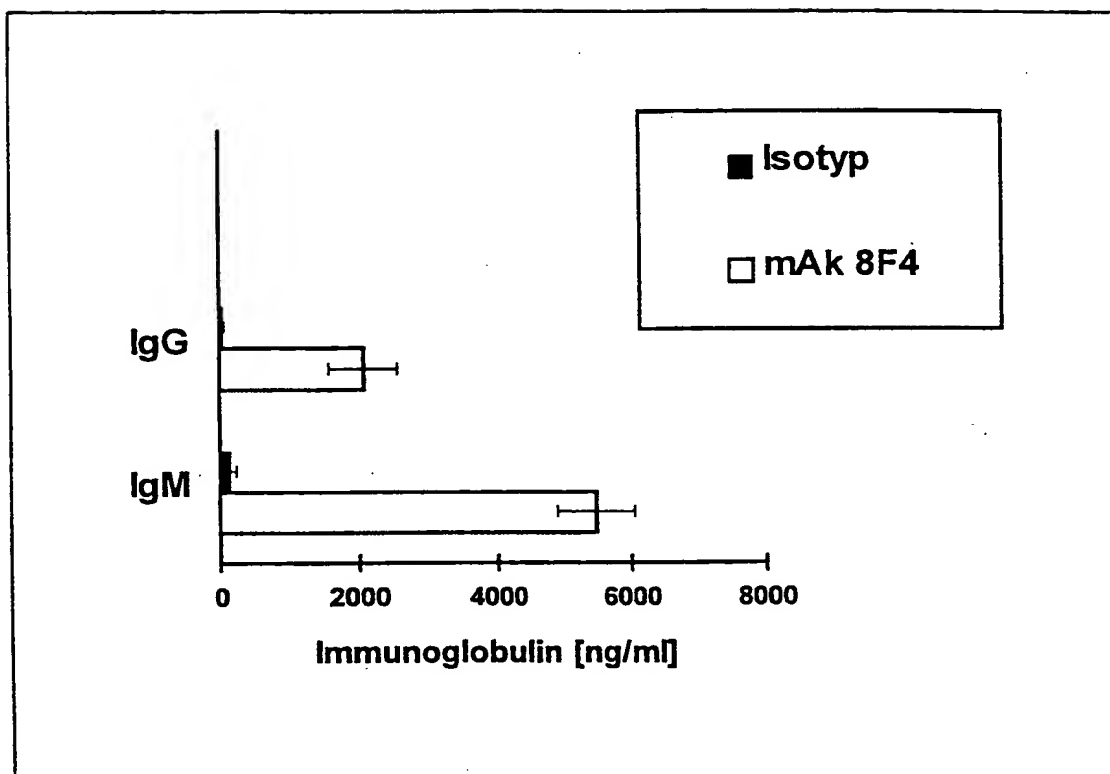


FIG. 9

11/17

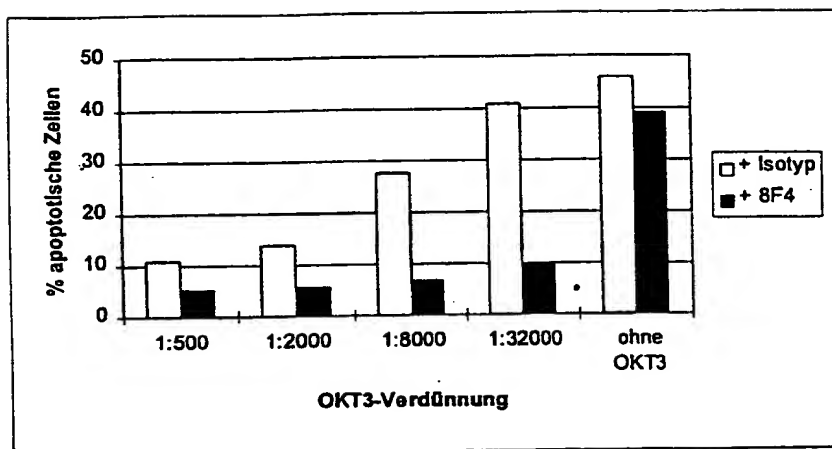


FIG. 10

12/17

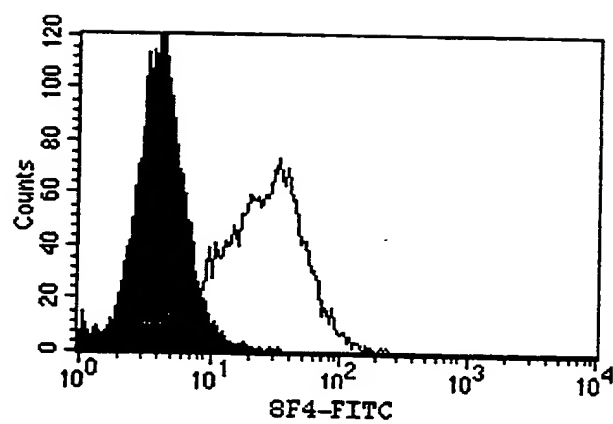


FIG. 11

13/17

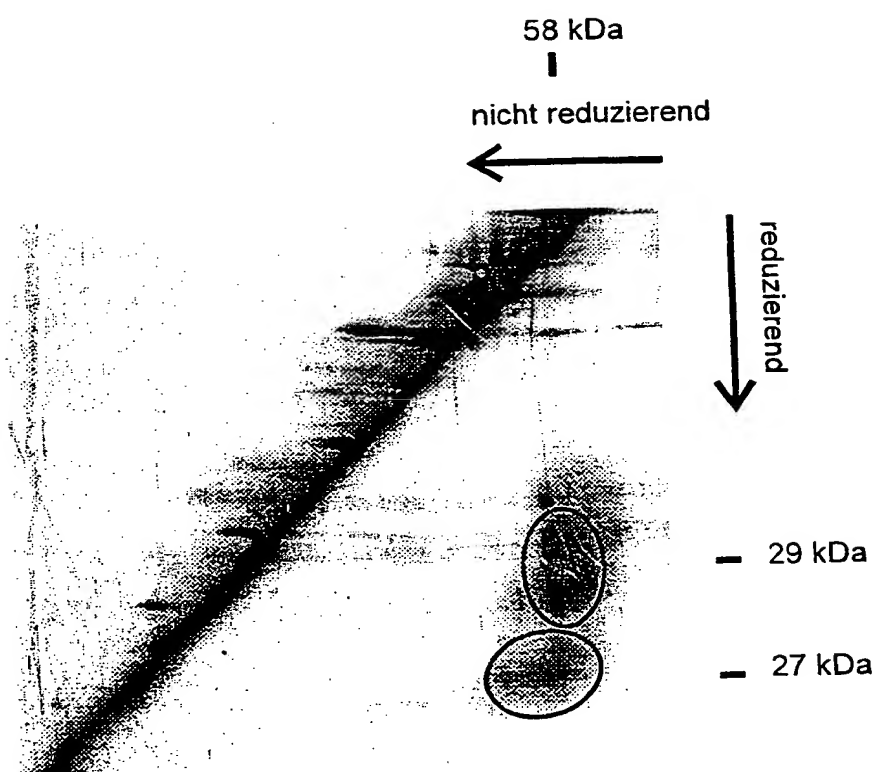


FIG. 12

14/17

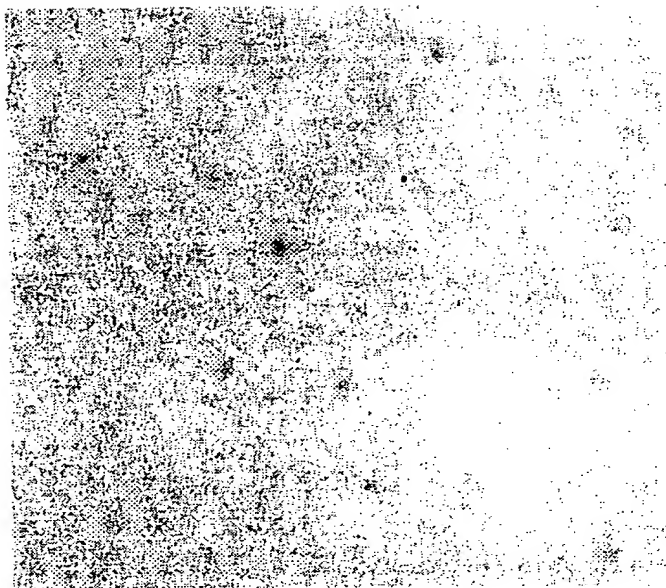


FIG. 13

15/17

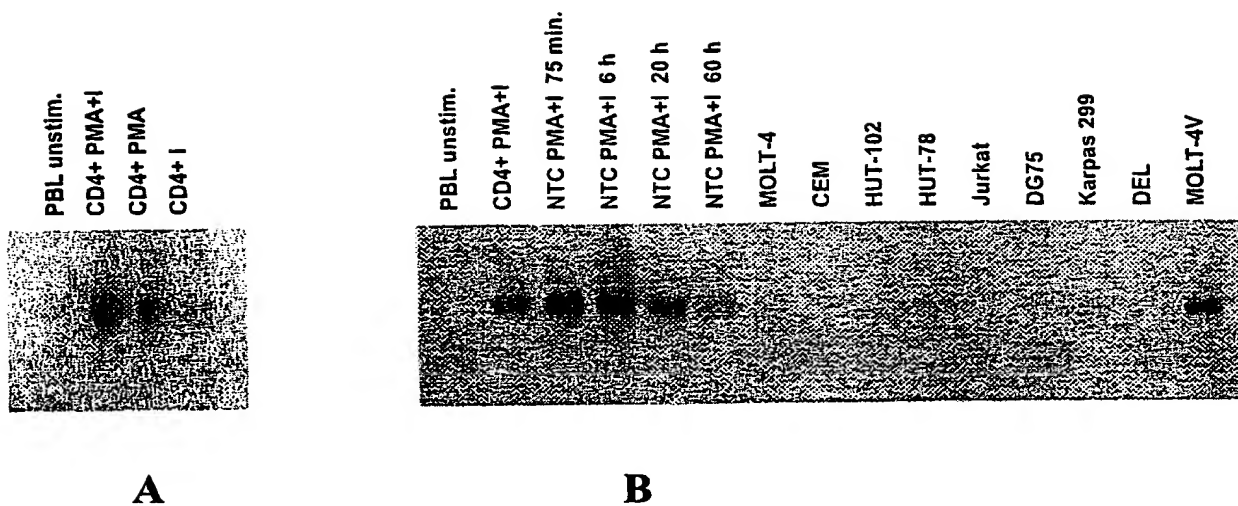


FIG. 14

16/17

MKSGLWYFFLFCLRIK VLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLL
KGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYYFCNLSI
FDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYS
SSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

FIG. 15

CGAGAGCCTGAATTCAGTCTGTCAGCTTTGAACACTGAACGCGAGGACTGTTAACTGTTTCT
GGCAAACATGAAGTCAGGCCTCTGGTATTTCTTTCTCTTCTGCTTGCGCATTAAAGTTTT
AACAGGAGAAATCAATGGTTCTGCCAATTATGAGATGTTTATATTTTACAAACGGAGGTGT
ACAAATTTTATGCAAATATCCTGACATTGTCCAGCAATTTAAAATGCAGTTGCTGAAAGG
GGGGCAAATACTCTGCGATCTCACTAAGACAAAAGGAAGTGGAAACACAGTGTCCATTAA
GAGTCTGAAATTTCTGCCATTCTCAGTTATCCAACAACAGTGTCTCTTTTTTTCTATACAA
CTTGGAACATTCTCATGCCAACTATTACTTCTGCAACCTATCAATTTTTGATCCTCCTCC
TTTTAAAGTAACTCTTACAGGAGGATATTTGCATATTTATGAATCACAACCTTTGTTGCCA
GCTGAAGTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATG
CATACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG
TGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGTGAC
CCTATAATATGGAACCTCTGGCACCCAGGCATGAAGCACGTTGGCCAGTTTTCTCAACTT
GAAGTGCAAGATTCTCTTATTTCCGGGACCACGGAGAGTCTGACTTAACATACATACATCT
TCTGCTGGTGTGTTTTGTTCAATCTGGAAGAATGACTGTATCAGTCAATGGGGATTTTAAACA
GACTGCCTTGGTACTGCCGAGTCCTCTCAAAACAAACACCCTCTTGCAACCAGCTTTTGA
GAAAGCCCAGCTCCTGTGTGCTCACTGGGAGTGAATCCCTGTCTCCACATCTGCTCCTA
GCAGTGCATCAGCCAGTAAAACAAACACATTTACAAGAAAAATGTTTTAAAGATGCCAGG
GGTACTGAATCTGCAAAGCAAATGAGCAGCCAAGGACCAGCATCTGTCCGCATTTCACTA
TCATACTACCTCTTCTTTCTGTAGGGATGAGAATTCCTCTTTTAATCAGTCAAGGGAGAT
GCTTCAAAGCTGGAGCTATTTTATTTCTGAGATGTTGATGTGAAGTGTACATTAGTACAT
ACTCAGTACTCTCCTTCAATTGCTGAACCCCAGTTGACCAATTTTACCAAGACTTTAGATG
CTTTCTTGCGCCCTCAATTTTCTTTTTTAAAAATACTTCTACATGACTGCTTGACAGCCCA
ACAGCCACTCTCAATAGAGAGCTATGTCTTACATTCTTTCCTCTGCTGCTCAATAGTTTT
ATATATCTATGCATACATATATACACACATATGTATATAAAATTCATAATGAATATATTT
GCCTATATTCTCCCTACAAGAATATTTTTGCTCCAGAAAGACATGTTCTTTTCTCAAATT
CAGTTAAAATGGTTTACTTTGTTCAAGTTAGTGGTAGGAAACATTGCCCGGAATTGAAAG
CAAATTTATTTTATTATCCTATTTTCTACCATTATCTATGTTTTTCATGGTGTCTATTAATT
ACAAGTTTAGTTCTTTTTGTAGATCATATTTAAAATTGCAAACAAAATCATCTTTAATGGG
CCAGCATTCTCATGGGGTAGAGCAGAATATTCATTTAGCCTGAAAGCTGCAGTTACTATA
GGTTGCTGTGAGACTATAACCCATGGTGCCTCTGGGCTTGACAGGTCAAATGGTCCCAT
CAGCCTGGAGCAGCCCTCCAGACCTGGGTGGAATTCAGGGTTGAGAGACTCCCTGAGC
CAGAGGCCACTAGGTATTCTTGCTCCAGAGGCTGAAGTCACCCTGGGAATCACAGTGGT
CTACCTGCATTCATAATTCCAGGATCTGTGAAGAGCACATATGTGTGAGGGCACAAATTC
CTCTCATAAAAACCACACAGCCTGGAAATTGGCCCTGGCCCTTCAAGATAGCCTTCTTTA
GAATATGATTTGGCTAGAAAGATTCTTAAATATGTGGAATATGATTATTCTTAGCTGGAA
TATTTTCTCTACTTCTGTCTGCATGCCCAAGGCTTCTGAAGCAGCCAATGTCGATGCAA
CAACATTTGTAACTTTAGGTAACTGGGATTATGTTGTAGTTTAACATTTTGTAACTGTG
TGCTTATAGTTTACAAGTGAGACCCGATATGTCATTATGCATACTTATATTATCTTAAGC
ATGTGTAATGCTGGATGTGTACAGTACAGTACTGAACTTGTAATTTGAATCTAGTATGGT
GTTCTGTTTTTCACTGACTTGGACAACCTGACTGGCTTTGCACAGGTGTTCCCTGAGTTG
TTTGCAGGTTTCTGTGTGTGGGGTGGGGTATGGGGAGGAGAACCTTCATGGTGGCCACC
TGGCCTGGTTGTCCAAGCTGTGCCTCGACACATCCTCATCCCCAGCATGGGACACCTCAA
GATGAATAATAATTCACAAAATTTCTGTGAAATCAAATCCAGTTTTAAGAGGAGCCACTT
ATCAAAGAGATTTTAAACAGTAGTAAGAAGGCAAAGAATAAACATTTGATATTTCAGCAACT
G

FIG. 16

This Page Blank (uspto)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :
C07K 14/705, C12N 15/12, 5/10, C07K 16/28,
C12N 5/12, G01N 33/53, A61K 38/17, C12Q
1/68

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/15553**

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

1. April 1999 (01.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02896

(22) Internationales Anmeldedatum: 23. September 1998
(23.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 41 929.1 23. September 1997 (23.09.97) DE
198 21 060.4 11. Mai 1998 (11.05.98) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUN-
DESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch
DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH-INSTITUTS
[DE/DE]; Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KROCZEK, Richard
[DE/DE]; Molekulare Immunologie, Robert-Koch-Institut,
Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE).

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

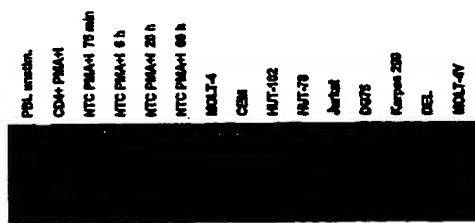
(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-
richts: 20. Mai 1999 (20.05.99)

(54) Title: COSTIMULATING T-CELL POLYPEPTIDE, MONOCLONAL ANTIBODIES, THEIR PREPARATION AND USE

(54) Bezeichnung: KO-STIMULIERENDES POLYPEPTID VON T-ZELLEN, MONOKLONALE ANTIKÖRPER SOWIE DIE HER-
STELLUNG UND DEREN VERWENDUNG



A



B

(57) Abstract

A polypeptide (8F4 molecule) with a T-cell costimulating biological activity is disclosed, as well as monoclonal antibodies against said 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies, the use as medicaments of substances which inhibit the biological activity of the disclosed 8F4 polypeptide, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, in particular for preventing or treating diseases which involve the immune system, the use of said 8F4 molecule or cells containing said 8F4 molecule as medicaments, in particular for preventing or treating diseases which involve the immune system, and the use of substances which specifically recognise the disclosed polypeptide, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for diagnosing diseases which involve the immune system.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/DE 98/02896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/705 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/28 C12N5/12
G01N33/53 A61K38/17 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N G01N A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LANIER L L ET AL: "CD80 (B7) AND CD86 (B70) PROVIDE SIMILAR COSTIMULATORY SIGNALS FOR T CELL PROLIFERATION, CYTOKINE PRODUCTION, AND GENERATION OF CTL" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 154, 1 January 1995, pages 97-105, XP002018932 see the whole document	1-12
A	FREEMAN G J ET AL: "CLONING OF B-2: A CTLA-4 COUNTER-RECEPTOR THAT COSTIMULATES HUMAN T CELL PROLIFERATION" SCIENCE, vol. 262, 5 November 1993, pages 909-911, XP002069402 see the whole document	1-12
-/--		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 1999

Date of mailing of the international search report

23.03.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/02896

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 04180 A (T CELL SCIENCES INC) 19 April 1990 see page 74, line 13 ---	9-12
A	WO 89 10398 A (ELICO FOOD AB) 2 November 1989 see page 11, line 34 - page 12, line 16 see page 15, line 11 - page 16, line 17 ---	9-12
P,X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human Cell Surface Protein " GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER W75956, XP002094461 see the whole document & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3 September 1998 ---	1-3, 9-12, 16-19
P,X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human cell surface protein encoding cDNA" GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER V53199, XP002094462 see the whole document & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3 September 1998 -----	4-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/02896

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims Nos. 13-19, 25 and 26 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/02896

Although Claims Nos. 13-19, 25 and 26 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

Although Claims Nos. 20-24 relate to a diagnostic method which is carried out on the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...format patent family members

International Application No

PCT/DE 98/02896

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9004180 A	19-04-1990	AU 4416189 A	01-05-1990
		CA 2000308 A	06-04-1990
		WO 9208981 A	29-05-1992
		WO 9208980 A	29-05-1992
		US 5292636 A	08-03-1994
		US 5426029 A	20-06-1995
<hr/>			
WO 8910398 A	02-11-1989	AT 107353 T	15-07-1994
		AU 3539289 A	24-11-1989
		DE 68916244 D	21-07-1994
		DE 68916244 T	09-02-1995
		EP 0413727 A	27-02-1991
		JP 3505156 T	14-11-1991
		US 5198357 A	30-03-1993
<hr/>			

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02896

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 6	C07K14/705 G01N33/53	C12N15/12 A61K38/17	C12N5/10 C12Q1/68	C07K16/28	C12N5/12
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK					
B. RESEARCHIERTE GEBIETE					
Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07K C12N G01N A61K C12Q					
Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen					
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)					
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN					
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile				Betr. Anspruch Nr.
A	LANIER L L ET AL: "CD80 (B7) AND CD86 (B70) PROVIDE SIMILAR COSTIMULATORY SIGNALS FOR T CELL PROLIFERATION, CYTOKINE PRODUCTION, AND GENERATION OF CTL" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 154, 1. Januar 1995, Seiten 97-105, XP002018932 siehe das ganze Dokument				1-12
A	FREEMAN G J ET AL: "CLONING OF B-2: A CTLA-4 COUNTER-RECEPTOR THAT COSTIMULATES HUMAN T CELL PROLIFERATION" SCIENCE, Bd. 262, 5. November 1993, Seiten 909-911, XP002069402 siehe das ganze Dokument				1-12
-/-					
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen					
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie					
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :					
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist					
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist					
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)					
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht					
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist					
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist					
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden					
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist					
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche			Absendedatum des internationalen Recherchenberichts		
2. März 1999			23.03.99		
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Bevollmächtigter Bediensteter Bilang, J		

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 90 04180 A (T CELL SCIENCES INC) 19. April 1990 siehe Seite 74, Zeile 13 ---	9-12
A	WO 89 10398 A (ELLCO FOOD AB) 2. November 1989 siehe Seite 11, Zeile 34 - Seite 12, Zeile 16 siehe Seite 15, Zeile 11 - Seite 16, Zeile 17 ---	9-12
P,X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human Cell Surface Protein " GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER W75956, XP002094461 siehe das ganze Dokument & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3. September 1998 ---	1-3, 9-12, 16-19
P,X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human cell surface protein encoding cDNA" GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER V53199, XP002094462 siehe das ganze Dokument & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3. September 1998 -----	4-8

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 13-19, 25 und 26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Obwohl die Ansprüche 13-19, 25 und 26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Obwohl die Ansprüche 20-24 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ni ales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02896

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9004180 A	19-04-1990	AU 4416189 A	01-05-1990
		CA 2000308 A	06-04-1990
		WO 9208981 A	29-05-1992
		WO 9208980 A	29-05-1992
		US 5292636 A	08-03-1994
		US 5426029 A	20-06-1995
WO 8910398 A	02-11-1989	AT 107353 T	15-07-1994
		AU 3539289 A	24-11-1989
		DE 68916244 D	21-07-1994
		DE 68916244 T	09-02-1995
		EP 0413727 A	27-02-1991
		JP 3505156 T	14-11-1991
		US 5198357 A	30-03-1993

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

Page Blank (uspto)

his Page Blank (uspto)